



HAL
open science

Onco-fertilité: Impact des facteurs influençant la réserve ovarienne après chimiothérapie

Charlotte Sonigo

► To cite this version:

Charlotte Sonigo. Onco-fertilité: Impact des facteurs influençant la réserve ovarienne après chimiothérapie. Biologie de la reproduction. Université Paris-Saclay, 2018. Français. NNT: 2018SACLS184 . tel-02170510v1

HAL Id: tel-02170510

<https://theses.hal.science/tel-02170510v1>

Submitted on 2 Jul 2019 (v1), last revised 2 Jul 2019 (v2)

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.

Oncofertilité : impact des facteurs influençant la réserve ovarienne après chimiothérapie

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°568 Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie
(Biosigne)
Spécialité de doctorat : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Thèse présentée et soutenue au Kremlin Bicêtre, le 27 juin 2018, par

Charlotte SONIGO

Composition du Jury :

Monsieur Jacques Young PU-PH, Université Paris-Sud	Président
Madame Anne-Laure Todeschini MCU, Institut Jacques Monod, Paris	Rapporteuse
Monsieur Stéphane Fabre DR, INRA, Toulouse	Rapporteur
Madame Sophie Christin-Maître PU-PH, Université Pierre et Marie Curie, Paris	Examinatrice
Madame Nadine Binart DR1 Inserm, Université Paris-Sud	Directrice de thèse
Monsieur Michaël Grynberg PU-PH, Université Paris Sud	Co-Directeur de thèse

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse.

Je voudrais tout d'abord remercier **Monsieur le Professeur Jacques Young** de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse de sciences. La finesse de votre analyse, vos connaissances, vos conseils et vos qualités pédagogiques m'impressionnent toujours et sont une source d'inspiration pour moi. J'espère avoir la chance de collaborer avec vous dans le futur.

Merci à **Madame Anne-Laure Todeschini** et **Monsieur Stéphane Fabre** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci de l'attention que vous avez portée à cette thèse. Je tiens à vous exprimer mes sincères remerciements.

Merci à **Madame le Professeur Sophie Christin-Maitre** d'avoir accepté de juger ce travail. Votre présence tout au long de mon parcours médical, depuis mes premières années d'études de médecine jusqu'à cette thèse de sciences en passant par mon master 2 et ma thèse de médecine m'a toujours été très précieuse.

Du fond du cœur, je remercie le **Docteur Nadine Binart** d'avoir dirigé ce travail de thèse. Je suis fière et émue d'être ta dernière thésarde. Merci pour tout ce que j'ai appris à tes côtés. Merci pour ton énergie et ton dynamisme communicateur. Ta rigueur, ton enthousiasme, ton ouverture d'esprit et ta curiosité intellectuelle sont un vrai modèle pour moi. Merci pour nos échanges qui dépassent largement le cadre professionnel et m'apportent tant.

Enfin, je tiens à remercier le **Professeur Michaël Grynberg**. Pour une fois, j'ai vraiment le droit de te dire merci alors j'en profite ! Merci pour ta confiance, ta disponibilité et ton soutien sans faille. Je suis très fière et heureuse à l'idée de continuer à travailler à tes côtés et de poursuivre l'aventure. Yallah !

Je souhaiterais remercier ceux sans qui ce travail n'aurait pas pu avancer.

Tout d'abord, je remercie chaleureusement **Isabelle**. Merci pour ton implication, ton enthousiasme communicateur et tes conseils. Nos échanges m'apportent beaucoup tant sur le plan professionnel que personnel et j'espère qu'on pourra continuer à travailler ensemble.

Je tiens à remercier **Nathalie Ba** pour avoir réalisé les coupes d'ovaires, je suis consciente que ce travail est long et fastidieux mais il a été fondamental pour permettre ces études. Je remercie tout particulièrement **Olivier Trassard**. Merci pour ton aide précieuse pour l'utilisation du scanner de lames virtuelles et pour ton implication dans tout le travail de comptage qui n'aurait pu voir le jour sans toi.

Merci à toute l'équipe de Quantmetry sans qui le projet de comptage automatisé n'aurait pas pu avoir lieu! Un merci tout particulier à **Jérémy** pour avoir accepté de tenter le coup, à **Stéphane et Olivier** d'avoir relevé le défi et à **Nicolas** pour ta disponibilité et ton aide.

Enfin, merci à **Jonas**, pour m'avoir poussée à parler de mes problèmes de comptage à Jérémy, finalement tu avais raison, la machine fait mieux que l'Homme ! Et faute de ne l'avoir fait au moment de mon master, merci pour les graphiques des cycles des souris, je ne sais pas comment on aurait fait sans toi !

Je tiens à remercier tous les membres de l'U1185, au sein de laquelle j'ai passé 4 belles années de thèse.

Un grand merci tout particulier à **Françoise**. Merci pour ta présence, ta gentillesse, ta patience, ton aide, ton soutien, ta bienveillance. Ces 4 années à tes côtés m'ont énormément apporté et j'espère bien qu'on restera en contact encore de nombreuses années !

Merci à **Marc** pour m'avoir accueillie chaleureusement dans l'unité et pour tes bons conseils, à **Say** pour ton investissement au laboratoire et pour le bon plan du cuisiniste, à **Stéphanie** pour ta bienveillance, j'espère qu'on aura l'occasion d'échanger encore; à **Jérôme B** pour ton soutien et tes conseils ; à **Damien**, ton savoir sur tout m'impressionne ; à **Jérôme F** pour ton aide avec adobe illustrator et tes bons conseils pour les travaux à la maison ; à **Larbi** qui a toujours un mot gentil, à **Laetitia**, c'est un plaisir d'échanger avec toi, j'espère qu'on restera en contact ; à **Peter**, pour tes conseils et ton soutien pour ma candidature de MCU-PH, j'espère sincèrement qu'on continuera à travailler ensemble ; à **Cindy** pour ton efficacité. Aux masters et thésards qui ont travaillé à mes

côtés au laboratoire au cours de ces années et en particulier à **Mohsen** et **Fabien**, c'était un vrai plaisir de partager le bureau avec vous cette année ; à **Florian** pour le bon plan de l'appart à Antony ; à mes « co-thésards » actuels, **Mirella**, **Laurence**, **Géraldine**, **Thi-An**, **Simon**, bon courage pour la suite ! Et à tous les masters actuels et passés avec qui j'ai eu la chance de partager de bons moments.

Un merci tout particulier à celles que j'ai rencontrées au labo, mais qui sont devenues bien plus que des collègues de travail, essentiellement à **Justine** et **Nadège**, jamais je n'oublierai mon année de master 2 à vos côtés qui a été si merveilleuse aussi bien sur le plan professionnel que personnel ; à **Valérie**, pour notre belle relation ; à **Ingrid** pour ton amitié précieuse.

Je voudrais remercier tous ceux avec qui j'ai eu la chance de travailler au cours de ces dernières années.

A toute l'équipe des **services de Médecine et de Biologie de la Reproduction** de l'**Hôpital Jean Verdier** et aux **internes** que j'ai eu la chance d'encadrer pour leurs mémoires et thèses et qui sont souvent devenus des ami(e)s. Un merci tout particulier à **Jean Noël Hugues** et **Isabelle Cédrin-Durnerin** qui ont cru en moi dès mes premiers pas en Médecine de la Reproduction ; à **Clémence** pour notre belle amitié qui a démarré à Jean Verdier et qui ne fait que se renforcer avec le temps, merci pour ta confiance. A **Alexandra**, je suis tellement contente de te retrouver à Clamart ! A **Héloïse**, on a finalement eu la chance de travailler un peu ensemble, mais c'était trop court. Merci pour notre amitié qui m'est si chère et précieuse. Et un grand merci à **Nathalie**. Je ne sais comment te remercier pour ton soutien sans faille et tes conseils avisés qu'il soit midi ou minuit, que ce soit sur une présentation, une « story », un manuscrit martyr ou mon manuscrit de thèse... j'adore nos discussions sans fin, tant personnelles que professionnelles. Mille mercis !

Merci à toutes les gynécologues médicales avec qui j'ai la chance d'échanger, de collaborer, de travailler, de discuter et plus encore et qui sont souvent devenues des amies. En particulier à **Justine**, pour notre jolie collaboration ; à **Maeliss**, que notre relation reste toujours aussi sincère et constructive, à **Lorraine** pour ta bienveillance et nos déjeuners que j'apprécie énormément !, à **Clémence** pour notre année commune au laboratoire, bon courage pour la suite ! Et un grand merci à **Madame Gompel** et **Geneviève** qui m'ont tant appris. Pas un jour je n'ai regretté le choix de notre spécialité.

A l'équipe de Gynécologie du KB et en particulier au **Pr Fernandez** pour leur accueil chaleureux.

Enfin, je souhaiterais remercier mes proches.

Merci à tous mes amis et ma famille pour votre soutien et votre fidélité. Pour ces bons moments passés ensemble, ces vacances, week-ends, diners, coinches, fou rire et autres ... et ce n'est qu'un début.... J'ai tellement de chance d'être si bien entourée, pour le meilleur et pour le pire.

Je remercie avec beaucoup de sincérité et d'affection tout ma belle-famille. Même si je reste, dans le monde professionnel, Dr Sonigo, je suis particulièrement fière d'appartenir à la **famille El Habouz** !

Enfin, merci à ma famille proche qui j'aime tant. A **Maman** qui est toujours là. Merci pour ton amour, ta présence, ton soutien sans faille, ton aide si précieuse au quotidien, ta disponibilité pour moi et pour les filles. Merci d'avoir toujours cru en moi. Merci pour tout. Merci **Papa** pour ton amour, nos déjeuners qui me sont si chers, ton soutien et tes conseils de sage et plus encore. Merci **Evelyne** pour ta présence et ta bienveillance. Merci à **Caroline, Julie et David**, je suis tellement heureuse et fière de vous avoir comme frère et sœurs que j'ai du mal à trouver les mots pour vous exprimer tout ce que je ressens. Merci d'avoir si bien choisi **Lionel, Jérôme et Noémie** qui sont bien plus, pour moi, que de simples beaux-frères et belle-sœur et que je remercie également! Et enfin à mes neveux et nièces que j'adore. Que nos moments en famille continuent à se faire avec autant de joies et d'amour !

Et pour terminer, je remercie avec énormément d'amour et d'émotion **Jonas, Emma et Maya** qui me comblent de bonheur au quotidien.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières.....	7
Table des illustrations.....	9
Liste des abréviations	11
INTRODUCTION.....	17
ETAT DES CONNAISSANCES.....	21
I. Folliculogenèse et fonction ovarienne.....	22
A. Généralités	22
B. De la différenciation ovarienne à l’initiation de la croissance folliculaire.....	24
C. Croissance folliculaire basale : du follicule primaire au petit follicule antral	37
D. Croissance folliculaire terminale et ovulation	42
II. L’hormone anti-Müllérienne.....	46
A. Généralités.....	46
B. AMH dans l’ovaire : aspects fondamentaux.....	48
C. AMH en pratique clinique chez la femme	53
III. Cancer et fertilité	58
A. Gonadotoxicité des chimiothérapies	58
B. Conséquences de la gonadotoxicité sur la fonction ovarienne.....	60
C. Fertilité après cancer	61
D. Préservation de la Fertilité	62
OBJECTIFS.....	71
RESULTATS	75
I. Première partie: L’AMH protège la réserve ovarienne chez les souris traitées par le cyclophosphamide.....	77
A. Introduction	77
B. Article 1.....	81

C. Discussion et perspectives.....	83
II. Deuxième partie. Comptage des follicules primordiaux par deep learning, l'intelligence artificielle au service de l'étude de la reproduction.....	89
A. Introduction.....	89
B. Article 2.....	95
C. Discussion et perspectives.....	97
DISCUSSION GENERALE	103
I. Mécanismes de gonadotoxicité des chimiothérapies	106
A. Modèles expérimentaux.....	106
B. Altération de l'ADN, atresie folliculaire et voies de réparation.....	107
C. Recrutement accéléré des follicules primordiaux.....	109
D. Altérations stromales et vasculaires.....	110
II. Agents permettant de limiter la déplétion folliculaire liée à la chimiothérapie.....	111
II. AMH recombinante en thérapeutique	115
A. Applications thérapeutiques dans le domaine de la reproduction.....	115
B. Applications thérapeutiques en oncologie.....	117
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	118
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	122
ANNEXES	158
I. Annexe 1.....	160
II. Annexe 2.....	162
III. Annexe 3.....	164

Table des illustrations

Figures

- Figure 1. Différentes étapes de la folliculogénèse.
- Figure 2. Dynamique folliculaire et temporalité chez la femme et chez la souris.
- Figure 3. Principaux facteurs impliqués dans le développement et la différenciation ovarienne.
- Figure 4. Acteurs impliqués dans la cassure des syncytia et l'assemblage des follicules primordiaux.
- Figure 5. Evolution du nombre de cellules germinales au cours de la vie chez la femme.
- Figure 6. Représentation simplifiée de la voie PI3K intra-ovocytaire
- Figure 7. Principaux facteurs impliqués dans la régulation de l'activation des follicules primordiaux
- Figure 8. Croissance folliculaire basale chez la femme et chez la souris.
- Figure 9. Membres de la famille TGF β impliqués dans la croissance folliculaire
- Figure 10. Comparaison du cycle œstrien de la souris et du cycle menstruel chez la femme.
- Figure 11. Représentation schématique simplifiée de la voie d'activation de la famille des TGF β .
- Figure 12. Profil d'expression de l'AMH et ses rôles au cours de la folliculogénèse.
- Figure 13. Variations de l'AMH de la conception à la ménopause.
- Figure 14. Principes de la stimulation de l'ovulation en préservation de la fertilité
- Figure 15. Principes de maturation *in vitro* (MIV).
- Figure 16. Principes de la cryopréservation de cortex ovarien
- Figure 17. Techniques de préservation de la fertilité féminine disponibles aujourd'hui
- Figure 18. Principales étapes de l'autophagie.
- Figure 19. Principaux mécanismes de régulation de l'autophagie
- Figure 20. Hypothèse du mécanisme d'action de l'AMH pour protéger le pool folliculaire
- Figure 21. Etapes de préparation des coupes d'ovaires avant analyse
- Figure 22. Exemple de reconnaissance d'image grâce à un réseau de neurones à convolution
- Figure 23. Algorithme de classification des différents follicules ovariens
- Figure 24. Comparaison histologique d'une coupe d'ovaire de femme et de souris
- Figure 25. Première hypothèse de gonadotoxicité de la chimiothérapie: apoptose des follicules primordiaux.
- Figure 26. Seconde hypothèse de gonadotoxicité de la chimiothérapie: effet « burn out ».

Tableaux

- Tableau 1. Classification des molécules de chimiothérapie en fonction de leur gonadotoxicité
- Tableau 2. Différentes molécules proposées chez la souris pour limiter la déplétion folliculaire induite par la chimiothérapie.

Liste des abréviations

ACI	: Aménorrhée chimio-induite
ALK	: Activin Receptor-like Kinase
AMH	: Anti-Müllérienne Hormone
AMHR2	: Récepteur de l'AMH de type 2
AMP	: Assistance Médicale à la Procréation
AMPc	: AMP cyclique
ATG	: Autophagy related gene
ATM	: Mutation ataxie télangiectasie
BAX	: Bcl-2- associée à la protéine X
BCL2	: B-Cell Lymphoma/Leukemia 2
BMP	: Bone Morphogenetic Protein
CDB	: Cassures double brin
CDK	: Cyclin-Dependent-Kinase
CFA	: Compte des follicules antraux
CGP	: Cellule Germinale Primordiale
CNN	: Réseau de neurones à convolution
COCs	: Complexes cumulo-ovocytaire
CTO	: Cryoconservation de tissu ovarien
CQ	: Chloroquine
Cy	: Cyclophosphamide
E2	: œstradiol
EGF	: Epidermal Growth Factor
ENSAI	: Ecole nationale de la statistique et de l'analyse de l'information
ER	: Récepteur des œstrogènes
FGF9	: Fibroblast Growth Factor 9
FIGLA	: Factor In the Germline A
FIV	: Fécondation <i>In Vitro</i>
FOXL2	: Forkhead Box L2
FOXO	: Forkhead box protein O
FSH	: Follicular Stimulating Hormone
GDF9	: Growth and Differentiation Factor 9
GnRH	: Gonadotropin Releasing Hormone
GSK3	: Glycogen Synthase Kinase family 3
HGF	: Hepatocyte Growth Factor

IA : Intelligence Artificielle
 IGFBP1 : Insulin Growth Factor Binding Protein 1
 IOP : Insuffisance Ovarienne Primaire
 KGF : Keratinocyte Growth Factor
 KIT-L : Kit-Ligand
 LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3
 LH : Luteinizing Hormone
 LHX : Lim Homeobox
 MII : Métaphase 2
 MOF : Follicules Multi-Ovocytes
 MP : Moutarde phosphoramide
 mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin
 mTORC : Mammalian Target Of Rapamycin Complex
 MIS : Müllerian Inhibiting Substance (ancien nom de l'AMH)
 MIV : Maturation *In Vitro*
 NOBOX : Newborn Ovary Homeobox
 PMAIP1 ou NOXA : Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
 p70S6K : p70 Ribosomal S6 Kinase
 PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
 PDK1 : Pyruvate Dehydrogenase Kinase, isoenzyme 1
 PF : Préservation de la Fertilité
 PHRC : Projet Hospitalier de Recherche Clinique
 PKB : Protein Kinase B (plus communément appelée AKT)
 PIP2 : Phosphatidylinositol Bisphosphate
 PIP3 : Phosphatidylinositol Triphosphate
 PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase
 PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog
 PUMA : p53 Up Modulator of Apoptosis
 RSP01 : R-Spondin1
 S6K : S6 kinase
 SCP1 : Synaptonemal Complex Protein 1
 SF1 : Steroidogenic Factor 1
 SOX9 : SRY-Box Containing gene 9
 SRY : Sex Determining Region of the Y Chromosome
 SOHLH : Spermatogenesis and oogenesis-specific Helix Loop factors
 SOPK : Syndrome des Ovaires Polykystiques
 TSC : Tuberous Sclerosis
 TGF : Transforming Growth Factor
 VEGF : Vascular-Endothelial Growth Factor

WNT : Wingless-Type MMTV Integration Site Fam

WT1 : Wilms Tumor Protein 1

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications et aux communications suivantes :

- **Publications**

AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in cyclophosphamide-treated mice

Charlotte Sonigo, Isabelle Beau, Michael Grynberg , and Nadine Binart

Soumis FASEB J

High-throughput ovarian follicle counting by an innovative deep learning approach

Charlotte Sonigo, Stéphane Jankowski, Olivier Yoo, Olivier Trassard, Nicolas Bousquet, Michaël Grynberg , Isabelle Beau and Nadine Binart

Scientific Reports (en révision)

- **Communications orales**

L'AMH, une nouvelle promesse pour protéger la réserve ovarienne au cours de la chimiothérapie

Communication orale, Prix de la meilleure communication orale

35^{ème} Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Poitiers, Octobre 2017

Recombinant AMH prevents primordial follicle loss and long term fertility alteration in cyclophosphamide treated mice

Sélectionné pour communication orale

Congrès de l'European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Barcelone, Juillet 2018

Apport du Deep Learning dans la préservation de la fertilité en cas de cancer du sein

Communication

Soirée « Santé du Sein à l'heure du Digital : Evolution ? Révolution ! », soirée organisée dans le cadre d'Octobre Rose, Octobre 2017

INTRODUCTION

Introduction

Depuis ces dernières décennies, l'incidence des cancers est en constante augmentation (Siegel *et al.*, 2018). L'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'à partir de 2030, 1.4 millions de femmes jeunes, en âge de procréer, sera nouvellement atteinte d'un cancer par an (Lyttle Schumacher *et al.*, 2017). Par ailleurs, les progrès thérapeutiques ont considérablement amélioré les taux de survie des enfants et des jeunes adultes atteints de cancer au prix de traitements potentiellement délétères pour la fonction de reproduction (Siegel *et al.*, 2018). Les mécanismes par lesquels les chimiothérapies affectent les ovaires ne sont que partiellement connus, chaque type de molécule semblant entraîner une altération du stock ovocytaire par des mécanismes différents. De plus, d'autres facteurs, tels que l'âge de la patiente et sa réserve ovarienne ou la nature et la dose cumulée de la chimiothérapie employée, participent également à la gonadotoxicité des traitements. Ainsi, une nouvelle population d'adultes jeunes, guéris de cancer et soumis aux effets secondaires délétères des traitements utilisés, a émergé au cours de ces dernières années et ne va cesser de croître. Désormais, l'objectif de la prise en charge n'est plus uniquement la guérison mais également l'assurance pour les patients de la même qualité de vie après le cancer. La fertilité tient une place clef dans celle-ci pour les femmes en âge de procréer. Par ailleurs, un nombre croissant de données laisse penser que la grossesse à distance d'un traitement du cancer ne semble pas influencer négativement le pronostic de la maladie. En conséquence, dans une majorité de cas, la grossesse ne constituera pas une contre-indication d'un point de vue oncologique.

L'oncofertilité est une nouvelle discipline qui s'est développée depuis une dizaine d'année. Une consultation spécialisée, réalisée idéalement avant l'initiation des traitements, fait maintenant partie intégrante du parcours de soin de ces patients comme le stipule le Plan Cancer 2014-2019 ou les différentes recommandations nationales internationales (Ethics Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2013; Lambertini *et al.*, 2016). Cet entretien a pour but d'informer les patients de l'impact de la prise en charge du cancer sur la fertilité et discuter de la mise en place des mesures ayant pour objectif de limiter l'altération de la fertilité ou de préserver des gamètes (Donnez and Dolmans, 2017). Si plusieurs techniques dites de préservation de la fertilité féminine sont aujourd'hui disponibles chez la femme, peu de naissances ont été rapportées lorsque la cryopréservation a été réalisée dans un contexte oncologique. Ainsi l'amélioration des méthodes actuellement disponibles et le développement de nouvelles stratégies sont un enjeu majeur en oncofertilité.

Introduction

Le projet de ce travail de Doctorat d'Université avait pour but de mieux comprendre les mécanismes d'atteinte de la fonction ovarienne lors des chimiothérapies afin de développer un nouveau traitement qui pourrait permettre de limiter l'altération de la réserve ovarienne chez ces patientes.

Avant d'exposer les résultats des travaux réalisés au cours de cette thèse, une introduction rappelle tout d'abord les différentes étapes de la folliculogenèse, depuis la mise en place des cellules germinales jusqu'à l'ovulation ainsi que leur régulation. Ce prérequis est indispensable afin de comprendre comment la chimiothérapie peut atteindre la fonction et la réserve ovarienne. Une deuxième partie de l'introduction est centrée sur l'Hormone Anti-Müllérienne (AMH), molécule au cœur de ce projet, essentiellement pour son rôle fondamental dans la physiologie ovarienne mais aussi pour l'intérêt de son dosage en pratique clinique. Enfin, une dernière partie est axée sur la fertilité après cancer, les mécanismes l'altérant et les méthodes disponibles à ce jour pour essayer de la préserver.

Les principaux résultats obtenus sont présentés sous forme de deux articles actuellement soumis pour publication. Chaque article est précédé d'une introduction ciblée permettant de mieux appréhender les travaux réalisés puis discuté. Cette partie « Résultats » est suivie d'une discussion générale, permettant de replacer les différents aspects de ce projet dans le paysage actuel de l'oncofertilité et une conclusion générale, comprenant les perspectives envisagées, termine ce manuscrit.

En annexe sont présentés (i) un projet de recherche clinique translationnelle, portant également sur l'oncofertilité, pour lequel je suis investigatrice principale; (ii) une revue portant sur les différentes techniques de préservation de la fertilité passées, actuelles et futures que j'ai écrite au cours de cette thèse ; (iii) et enfin un travail fondamental réalisé en parallèle au laboratoire au cours de mes années de thèse.

ETAT DES CONNAISSANCES

I. Folliculogenèse et fonction ovarienne

A. Généralités

La fertilité chez les mammifères résulte, entre autres, d'événements moléculaires complexes qui débutent pendant la vie intra-utérine avec la différenciation ovarienne puis la formation du stock de follicules constituant la réserve ovarienne. Ces follicules de réserve, appelés follicules primordiaux, sont constitués d'un ovocyte bloqué en première division de méiose, entouré de quelques cellules somatiques, appelées cellules de la granulosa. Dès la vie embryonnaire, certains follicules vont débiter les premières étapes de la croissance folliculaire. La croissance dite « basale » permet l'évolution du follicule primordial jusqu'au stade petit antral. Avant la puberté, tous les follicules ayant débuté leur croissance entrent en atresie à ce stade précoce de développement. Ce n'est qu'à partir de la puberté, sous l'influence des hormones hypophysaires, que ces follicules pourront poursuivre leur croissance jusqu'à l'ovulation (croissance terminale) (Figure 1).

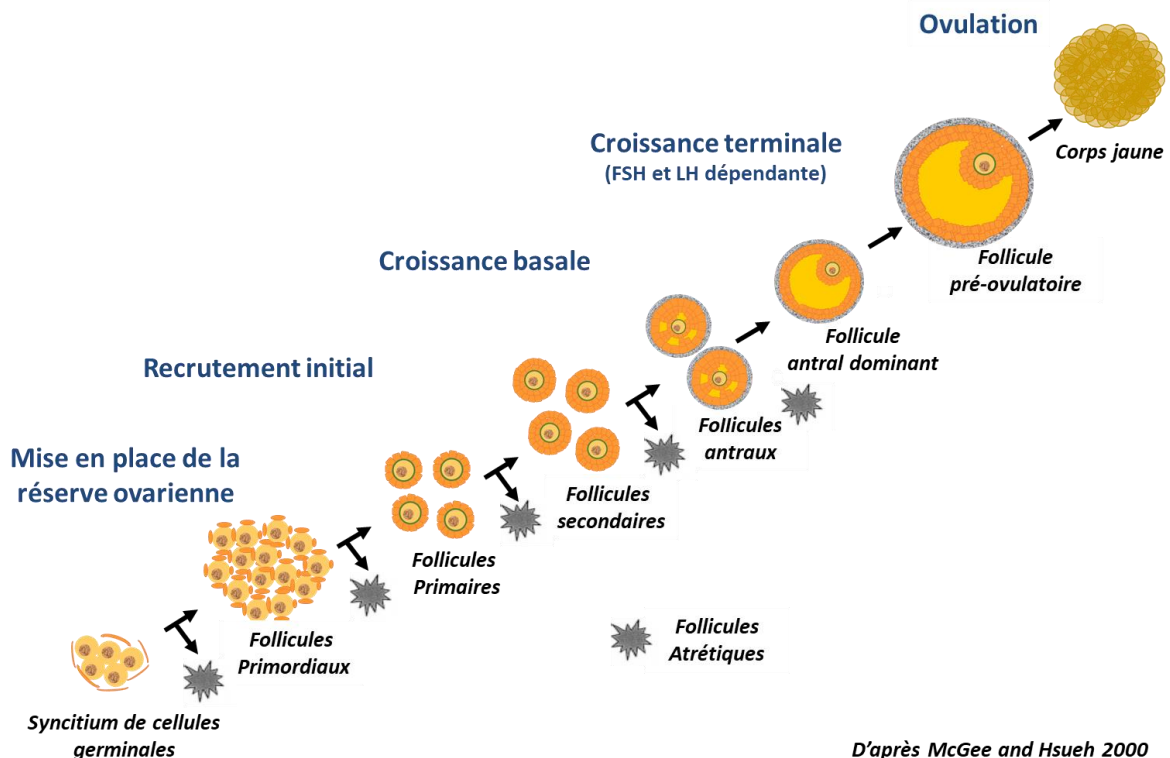
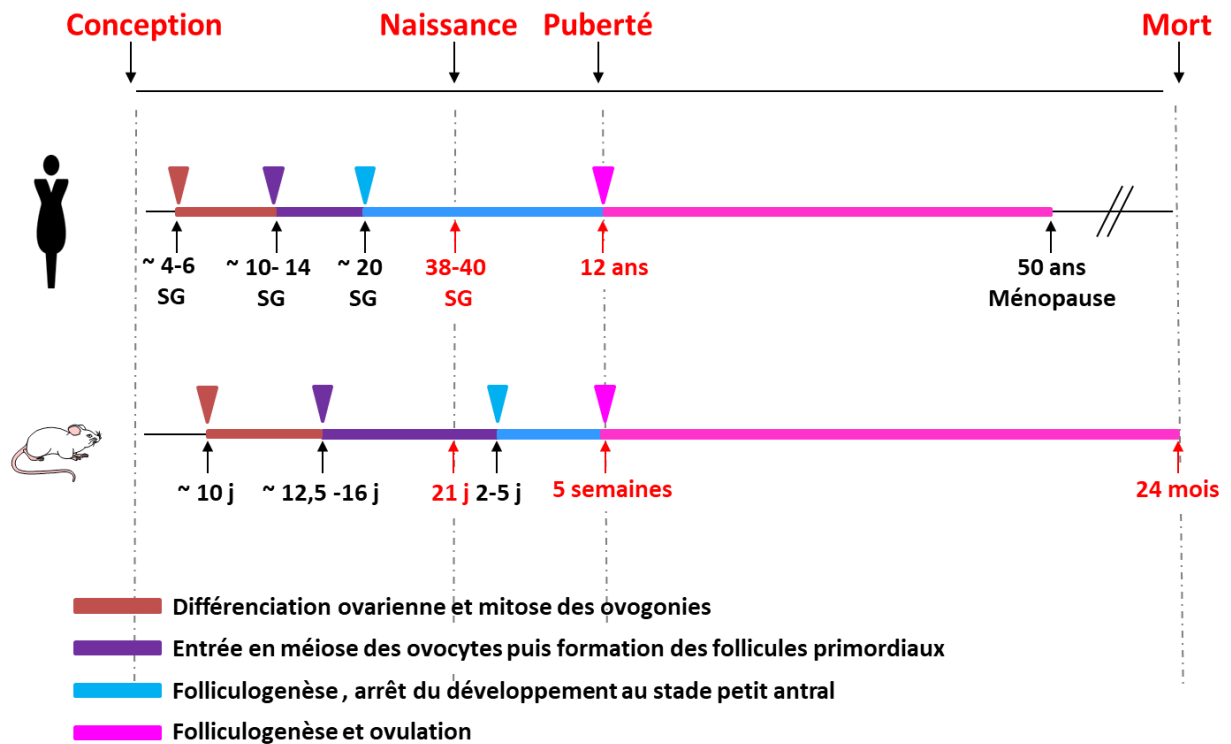


Figure 1. Différentes étapes de la folliculogenèse. Une fois que le pool des follicules de réserve est mis en place, le développement du follicule primordial en follicule pré-ovulatoire se divise en 3 grandes étapes: le recrutement initial qui correspond à l'activation des follicules au repos, la croissance basale qui permet le développement jusqu'au stade petit antral puis la croissance terminale qui ne démarre qu'à la puberté et peut aboutir à l'ovulation.

Chez la femme, les différentes étapes de la folliculogénèse commencent dès la vie fœtale et se poursuivent jusqu'à l'épuisement de la réserve ovarienne qui, physiologiquement, se situe vers l'âge de 50 ans. Cette dynamique folliculaire est conservée chez les mammifères mais avec une temporalité pouvant différer en fonction des espèces, notamment chez le rongeur, modèle couramment utilisé pour comprendre et évaluer la fonction ovarienne (Figure 2) (Monniaux *et al.*, 2014).



Adapté de Monniaux et al, 2014

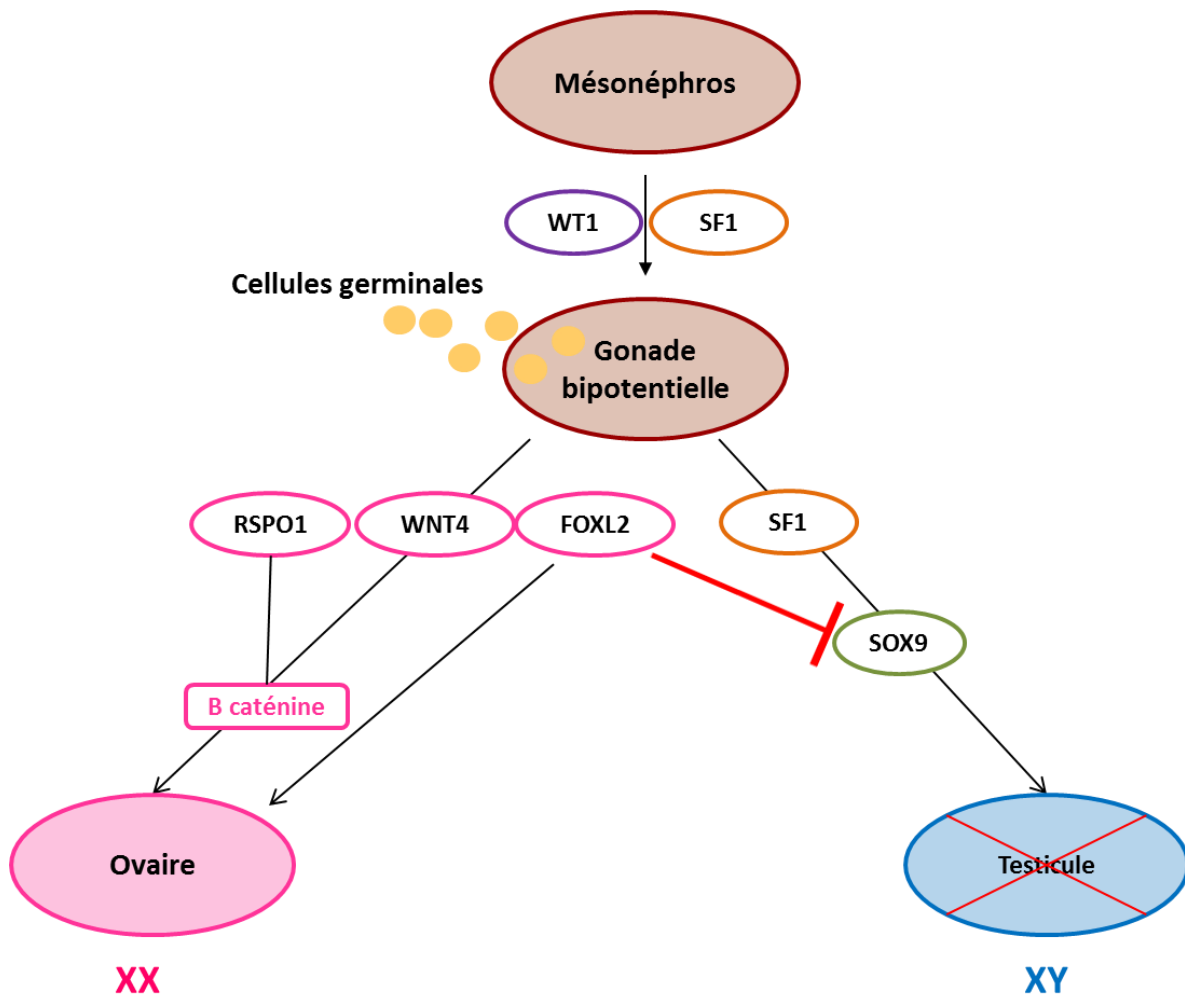
Figure 2. Dynamique folliculaire et temporalité chez la femme et la souris. Chez la femme, les différentes phases du développement sont exprimées en semaines de grossesse (SG) avant la naissance puis en années, alors que chez la souris, ils sont exprimés en jours après la conception (j) puis en semaines ou en mois. Le code couleur indique les phases essentielles depuis la différenciation ovarienne à l'ovulation.

B. De la différenciation ovarienne à l'initiation de la croissance folliculaire

1. Différenciation ovarienne

Les gonades se différencient à la surface du mésonéphros (rein embryonnaire), très tôt durant le développement embryonnaire, d'abord sous la forme d'une crête génitale identique dans les 2 sexes. Ce processus de formation initiale de la gonade est régulé par différents facteurs de transcription tels que WT1 (Wilms Tumor 1), LHX9 (Lim Homeobox 9) et SF1 (Steroidogenic Factor 1). La crête génitale est colonisée par des cellules germinales primordiales (CGPs), origine commune des spermatozoïdes et des ovocytes. Ces CGPs proviennent de la base de l'allantoïde, territoire extra-embryonnaire, et migrent vers la future gonade dès la 4^{ème} semaine de développement chez le fœtus humain et vers le 10^{ème} jour après la conception chez les souris (Guigon and Magre, 2006). Après leur migration dans les crêtes génitales, les CGPs, alors devenues ovogonies chez la femelle, prolifèrent et se multiplient par mitose. C'est au cours de cette période que les ovogonies atteignent leur nombre maximum, plus de 6.000.000 chez la femme (Richards and Pangas, 2010).

La différenciation sexuelle débute une fois que la gonade bipotentielle a été colonisée par les CGPs. La formation en testicule ou en ovaire dépend d'un ensemble de signaux cellulaires et hormonaux qui interagissent entre eux. Des études sur des modèles murins génétiquement modifiés ou l'évaluation de syndromes pathologiques humains ont permis de mettre en évidence de nombreux acteurs impliqués dans l'orientation de la gonade bipotentielle en testicule (SRY (Sex Determining Region of the Y Chromosome), SOX9 (SRY box containing gene 9), FGF9 (Fibroblast Growth Factor 9)...) ou en ovaire (Morel *et al.*, 2014). Le développement de l'ovaire est un phénomène actif qui débute vers la 7^{ème} semaine de gestation chez la femelle. Il nécessite à la fois la répression de SOX9, notamment par le facteur de transcription FOXL2 (Forkhead box L2), et l'activation de la voie WNT4 (Wingless-Type MMTV Integration site) / β -caténine modulée par RSPO1 (R-Spondin-1) (Chassot *et al.*, 2014; Pannetier *et al.*, 2016). Les principaux facteurs impliqués dans la différenciation ovarienne sont schématisés dans la figure 3.



Adapté de Morel et al, 2014 et Elzaïat et al, 2017

Figure 3. Principaux facteurs impliqués dans le développement et la différenciation ovarienne. Le développement de la gonade bipotentielle est contrôlé par différents facteurs de transcription tels que SF1 ou WT1. La formation de l'ovaire nécessite l'activation de RSP01, WNT4 et FOXL2 qui active la voie de la β -caténine. La maintenance de l'identité gonadique est assurée par une répression constante de SOX9 notamment par FOXL2

Un évènement majeur de la différenciation ovarienne est ensuite l'entrée en méiose des ovogonies qui commence pendant la vie intra-utérine. Ce phénomène démarre 12-13 jours après la conception chez la souris et aux alentours de la 12^{ème} semaine de grossesse chez la femme (Richards and Pangas, 2010). Le moment de l'entrée en méiose des cellules germinales est un évènement complexe, coordonné par des signaux provenant des cellules somatiques les entourant. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle crucial de l'acide rétinoïque dans l'initiation de la méiose tant chez le mâle que chez la femelle (Feng *et al.*, 2014; Teletin *et al.*, 2017). Par ailleurs, l'entrée en méiose des ovogonies induit une phase intense d'apoptose, faisant largement chuter le nombre de cellules germinales.

Les ovogonies, qui deviennent alors des ovocytes, progressent à travers les premiers stades de la prophase de la première division méiotique : leptotène, zygotène, pachytène jusqu'au stade diplotène dans lequel ils vont rester bloqués jusqu'à la reprise de la méiose qui pourra avoir lieu à la puberté. Ainsi, chez la femme, les ovocytes primaires restent bloqués en première division méiotique pendant de nombreuses années. Ces différentes étapes de la méiose sont finement régulées. Parmi les nombreux acteurs clefs, la cohésine, complexe de protéines exclusivement exprimées dans les cellules germinales et indispensables au bon déroulement de la prophase I de la première division méiotique a été mis en évidence (Baillet and Mandon-Pepin, 2012). Une mutation des gènes codant des facteurs impliqués dans la méiose peut induire une perte totale des ovocytes et donc une stérilité par insuffisance ovarienne.

2. Mise en place de la réserve folliculaire

Pendant le développement ovarien fœtal, les ovogonies puis les ovocytes sont connectés entre eux par des ponts cytoplasmiques. Ils forment alors des agrégats de cellules germinales, ou syncytia, organisés au sein de cordons ovigères et entourés par les cellules somatiques ovariennes (cellules de la pré-granulosa et cellules stromales mésenchymateuses) (Tingen *et al.*, 2009). Juste après la naissance chez la souris et au cours du deuxième trimestre de la grossesse chez la femme, ces syncytia se cassent pour constituer des follicules individuels. Environ un tiers des ovocytes primaires seront encapsulés par des cellules somatiques de la pré-granulosa afin de former des follicules primordiaux (Pepling and Spradling, 2001). Chez la souris comme chez la femme, la cassure des syncytia est à l'origine d'une perte considérable de cellules germinales qui impliquent, entre autres, des membres de la famille de BCL2 (B-Cell Lymphoma/leukemia 2) (Ghafari *et al.*, 2007; Albamonte *et al.*, 2008). Récemment, il a été suggéré que l'autophagie, un processus de dégradation lysosomale permettant de contrôler l'homéostasie cellulaire, jouait un rôle majeur dans la perte des cellules germinales et la mise en place du pool des follicules primordiaux (Sun *et al.*, 2017, 2018). Ces différentes étapes aboutissant à la formation de follicules primordiaux sont hautement conservées et sont aussi retrouvées chez la drosophile (de Cuevas *et al.*, 1997; Grive and Freiman, 2015).

La cassure des syncytia et le développement des follicules primordiaux sont finement régulés afin de sélectionner les ovocytes de meilleure qualité (Tingen *et al.*, 2009). Un des principaux acteurs de l'initiation de ce phénomène est la protéine SCP1 (Synaptonemal Complex Protein 1) exprimée uniquement par l'ovocyte (Paredes *et al.*, 2005). D'autres protéines et facteurs de transcription spécifiques des cellules germinales ou des cellules de la granulosa, comme FOXL2, NOBOX (Newborn Ovary Homeobox), FIGLA (Factor In the Germline α), des

membres de la voie de signalisation NOTCH ou de la superfamille TGF β (Transforming Growth Factor) comme BMP15 (Bone Morphogenetic Protein 15) et GDF9 (Growth and Differentiation factor 9) seraient également impliqués (Grive and Freiman, 2015)(Figure 4).

Ce sont des modèles murins qui ont permis de mettre en évidence le rôle de ces acteurs. Les souris invalidées pour ces gènes présentent soit une déplétion folliculaire massive très précoce par défaut de cassure des syncytia ou de formation des follicules primordiaux, soit de nombreux follicules multi-ovocytes (MOF) témoins d'une cassure incomplète de ces structures (Tingen *et al.*, 2009). Beaucoup de ces gènes connus pour affecter la cassure des syncytia chez la souris sont également important chez la femme. Enfin, en association avec les acteurs impliqués dans les voies de l'apoptose et les facteurs locaux, les hormones stéroïdes circulantes peuvent également réguler la cassure des syncytia et l'assemblage des follicules primordiaux. Par exemple, l'exposition néonatale de souris femelles à l'œstradiol (E2), des œstrogènes de synthèse (diethylstilbestrol) ou du bisphenol A, présentent de nombreux MOF à l'âge adulte (Pepling, 2012). Par ailleurs, quand les ovocytes sont exposés aux œstrogènes, la cassure des syncytia est inhibée (Chen *et al.*, 2007). Cependant, les mécanismes mis en jeu ne sont pas clairement établis. Ce double phénomène de cassure des syncytia et de formation des follicules primordiaux aboutit à la mise en place du stock folliculaire définissant la réserve ovarienne.

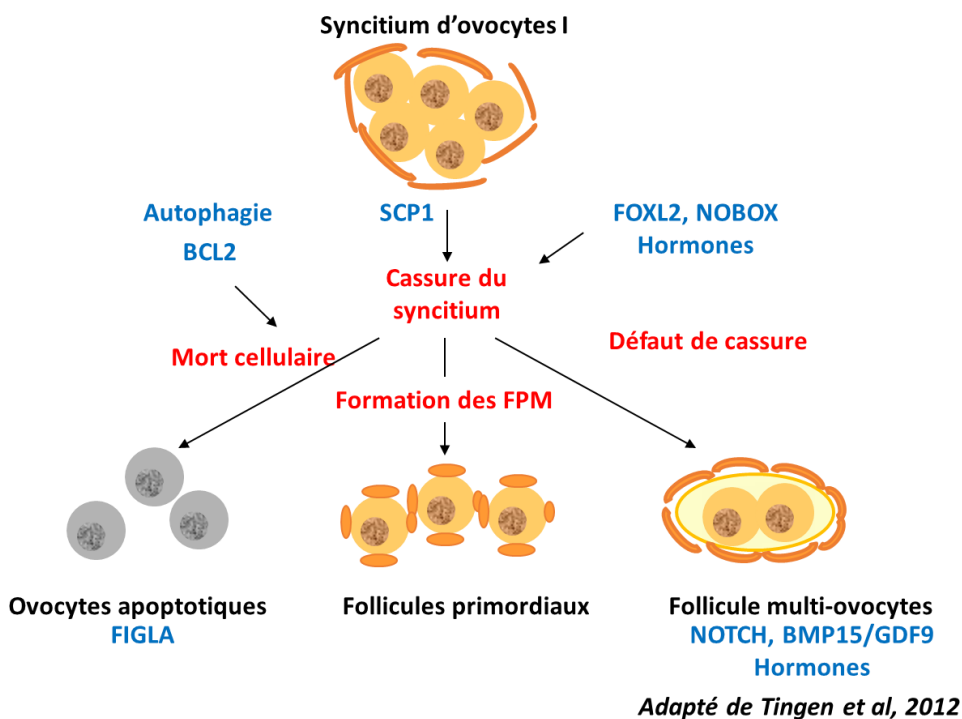


Figure 4. Acteurs impliqués dans la cassure des syncytia et l'assemblage des follicules primordiaux. La mise en place et le bon fonctionnement de la cassure des syncytia sont contrôlés par de nombreux facteurs. Une cassure anormale peut induire une augmentation de l'apoptose des follicules primordiaux ou la formation de follicules multi-ovocytes (MOF). Ce phénomène conduit à la mise en place du pool des follicules primordiaux.

3. Evolution de la réserve ovarienne

Le nombre de cellules germinales aux différents moments de la différenciation ovarienne et de la mise en place des follicules primordiaux est difficile à déterminer. Chez la femme, le nombre maximal de cellules germinales a été estimé aux alentours 6 millions vers la 20^{ème} semaine de grossesse, alors qu'il ne reste qu'un million d'ovocytes à la naissance (Baker, 1963). Plusieurs phases de mort des cellules germinales ont été identifiées, notamment au moment de l'entrée en méiose des ovogonies ou lors de la cassure des syncytia (Sun *et al.*, 2017). Après la naissance, le stock des follicules primordiaux ne cesse de décroître, conditionnant la durée de la vie reproductive (De Vos *et al.*, 2010) (Figure 5). Les données disponibles indiquent qu'il reste environ 400.000 follicules à la puberté. Enfin, ce nombre ne cesse de chuter pour être inférieur à 500 au moment de la ménopause. Ce phénomène de ménopause n'existe pas physiologiquement chez la souris. Cette diminution du nombre de follicules primordiaux est physiologique mais peut être accélérée dans le cadre de certaines anomalies chromosomiques ou génétiques ou secondaire à des expositions toxiques comme la chimiothérapie ou la radiothérapie. Lorsque l'épuisement du pool folliculaire arrive avant l'âge de 40 ans, on parle d'insuffisance ovarienne primaire (IOP) (De Vos *et al.*, 2010). Certaines équipes ont suggéré qu'il existait, chez la femme comme chez la souris, la possibilité de générer de nouveaux ovocytes pendant la vie adulte à partir de cellules germinales indifférenciées mais ces données sont largement controversées (Johnson *et al.*, 2005).

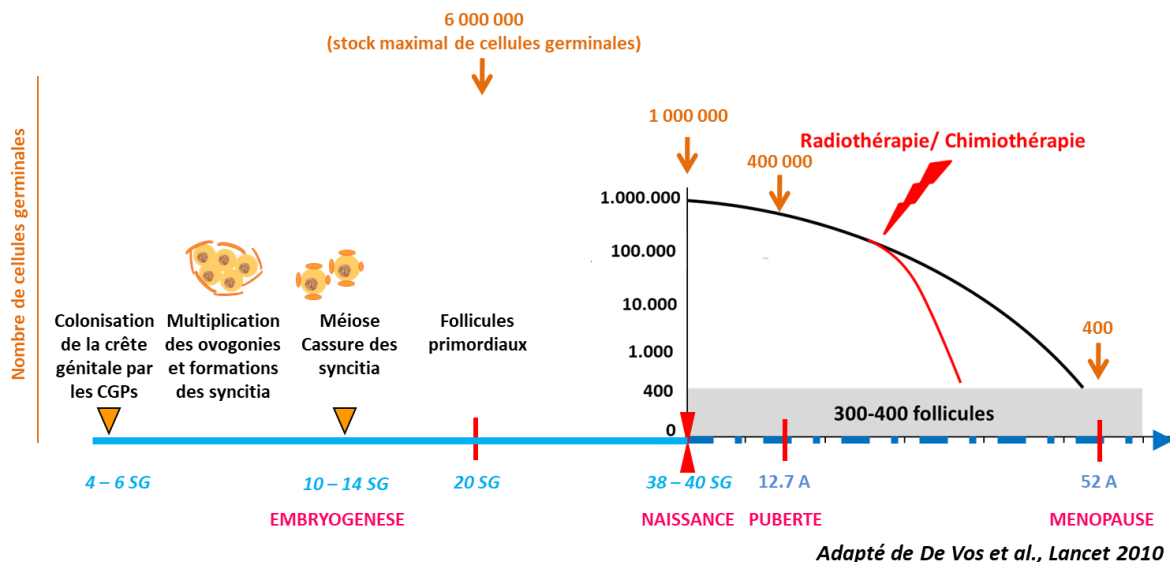


Figure 5. Evolution du nombre de cellules germinales au cours de la vie chez la femme. Le stock de follicules primordiaux atteint son maximum pendant la vie embryonnaire puis ne cesse de diminuer. Au moment de la ménopause, le nombre de follicules primordiaux est d'environ 400. Un traitement par chimiothérapie ou radiothérapie peut entraîner une déplétion plus rapide de la réserve ovarienne et donc une insuffisance ovarienne primaire. Le temps est exprimé en semaines de grossesse (SG) puis en années (A).

4. Mécanismes moléculaires régulant la survie et le recrutement initial des follicules primordiaux

Les follicules primordiaux constituant la réserve ovarienne peuvent avoir plusieurs devenir : (i) être activés et entrer en croissance, (ii) rester à l'état quiescent pendant une durée plus ou moins longue ou (iii) mourir directement depuis cet état de quiescence (Adhikari and Liu, 2009). L'activation, ou recrutement initial, est défini par une augmentation de taille de l'ovocyte s'accompagnant d'une différenciation des cellules de la granulosa aplaties en cellules cuboïdales.

Le maintien de la survie et l'activation folliculaire, deux phénomènes fondamentaux, et finement régulés, coexistent afin de permettre la reproduction et le fonctionnement ovarien tout au long de la vie reproductive. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la quiescence ou le recrutement des follicules primordiaux sont de mieux en mieux connus, notamment grâce aux multiples invalidations de gènes réalisées chez la souris. Ces animaux présentent alors, une déplétion folliculaire précoce. De nombreux facteurs activateurs ou inhibiteurs ont été mis en évidence (Reddy *et al.*, 2010). Ces facteurs, de nature différente (facteurs de transcription, acteurs de voies de signalisation, hormones ...), peuvent agir de manière autocrine, paracrine ou endocrine (Adhikari and Liu, 2009). Ils sont produits par les ovocytes et/ou par les cellules de la granulosa. Un dialogue fondamental entre ces deux types cellulaires permet la régulation de l'initiation de la folliculogénèse (Monniaux, 2016).

a. Voie de signalisation Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase (PI3K) intra-ovocytaire

Généralité sur la voie PI3K

PI3K est une kinase qui, après activation et recrutement par un récepteur à activité tyrosine kinase, phosphoryle PIP2 (Phosphatidylinositol Bisphosphate) en PIP3 (Phosphatidylinositol Triphosphate) et peut alors recruter une autre kinase PDK1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase, isoenzyme 1). Ce complexe va à son tour phosphoryler la protéine kinase B (PKB) (plus communément appelée AKT1) qui sera entièrement activée si elle est également phosphorylée sur un autre résidu (ser 473) par la kinase mTOR (mammalian Target of Rapamycin Target). Plusieurs substrats d'AKT ont été mis en évidence, parmi lesquels TSC2 (Tuberous Sclerosis 2), p27, ou des facteurs de transcription comme ceux de la famille FOXO (Forkhead box protein O). La phosphorylation de TSC2 par AKT déstabilise le complexe TSC1/TSC2 ce qui va alors phosphoryler, à son tour, mTOR. Le complexe mTORC1 est alors activé et va ainsi induire la phosphorylation de p70S6K (p70 ribosomal S6 kinase), la formation de ribosomes, la synthèse de certaines protéines ou encore l'autophagie. PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) est une

phosphatase majeure de cette voie de signalisation qui convertit PIP3 en PIP2. C'est donc le régulateur négatif de la voie PI3K (Figure 6) (Zheng *et al.*, 2012).

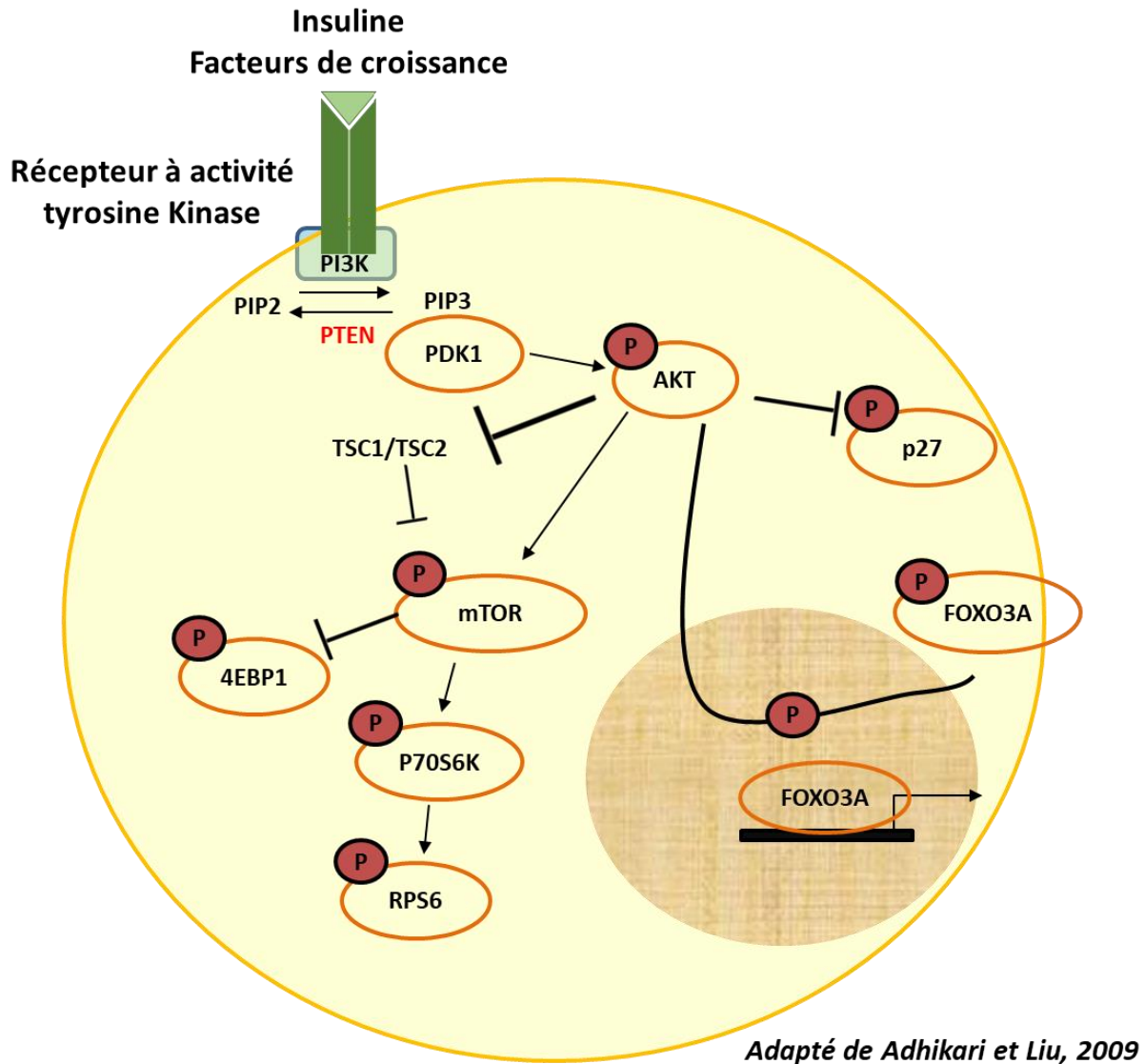


Figure 6. Représentation simplifiée de la voie PI3K intra-ovocytaire. Après la liaison du ligand au récepteur à activité tyrosine kinase, ont lieu la phosphorylation et l'activation de la voie PI3K. Le recrutement de PI3K du cytoplasme à la membrane interne de la cellule conduit à la production de PIP3 à partir de PIP2. La phosphatase PTEN, qui est un régulateur négatif de cette voie, convertit PIP3 en PIP2. Plusieurs kinases comme PDK1 et AKT sont alors activées en cascade. AKT a de nombreux substrats dont mTOR, p27 ou FOXO3A...

Rôles de la voie PI3K dans l'ovocyte

La voie de signalisation PI3K est ubiquitaire et son rôle est reconnu dans la survie, la régulation et la croissance de plusieurs types cellulaires. Plus récemment, plusieurs études ont mis en évidence l'importance de la voie PI3K intra-ovocytaire dans la régulation de la dormance et de l'activation folliculaires. Les expériences d'inactivation génique chez la souris de chacun des acteurs de cette voie, ont permis de montrer que PTEN et FOXO3A d'une part et PI3K/PDK1/AKT d'autre part inhibent et stimulent respectivement le recrutement des follicules primordiaux (Adhikari and Liu, 2009; Reddy *et al.*, 2010).

Une inactivation spécifique de *Pten* dans l'ovocyte de souris induit une activation des follicules primordiaux et une déplétion rapide du stock folliculaire responsable d'une IOP (Reddy *et al.*, 2008). La délétion ovocytaire de *Pten* chez des souris adultes a permis de mettre en évidence que ce contrôle de l'activation folliculaire par le système PI3K/PTEN persiste tout au long de la vie reproductive (John *et al.*, 2008). Cependant, lorsque *Pten* est invalidé uniquement dans les ovocytes des follicules ayant démarré leur croissance, le développement folliculaire n'est pas altéré, suggérant que ce système PI3K/PTEN est essentiel surtout pour l'activation des follicules primordiaux (Jagarlamudi *et al.*, 2009).

La signalisation PDK1 dans les ovocytes est cruciale pour maintenir la survie des follicules primordiaux. En effet, une inactivation ovocytaire de *Pdk1* chez la souris entraîne une IOP par accélération de la disparition des follicules primordiaux directement depuis leur état de quiescence (Reddy *et al.*, 2009). Ce rôle fondamental semble s'exercer par la cascade induite par rpS6 (S6K1 ribosomal protein) (Zheng *et al.*, 2012).

AKT, une des principales molécules de la voie signalisation PI3K, contrôle l'activation de la croissance des follicules primordiaux de plusieurs manières. Premièrement, elle régule le cycle cellulaire par phosphorylation et inactivation de GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase family 3). Par ailleurs, elle régule négativement des inhibiteurs des CDK (Cyclin-dépendant-kinase), telles que p27, connus pour être impliqués dans la transition des différentes phases du cycle cellulaire. Chez la souris, alors que p27 est exprimé dans les ovocytes des follicules primordiaux, primaires et secondaires, son expression est largement diminuée dans les ovocytes des follicules en croissance, suggérant que son rôle est essentiel dans l'initiation de la croissance ovocytaire (Rajareddy *et al.*, 2007). AKT régule aussi l'activation du complexe TSC1/TSC2 impliqué dans les mécanismes de survie et croissance cellulaires. Enfin, AKT phosphoryle FOXO3A, un des acteurs ovocytaires clefs, impliqué dans le recrutement des follicules primordiaux.

FOXO3A

Le facteur de transcription FOXO3A, essentiellement exprimé dans les ovocytes des follicules au repos, agit en aval de la voie de signalisation PI3K/PDK1/AKT et semble être le principal acteur engagé dans l'activation folliculaire (Adhikari and Liu, 2009). Quand FOXO3A est actif, il n'est pas phosphorylé et est localisé dans le noyau de l'ovocyte empêchant l'entrée en croissance du follicule primordial. Une activation constitutive de FOXO3A dans les ovocytes de souris permet de maintenir l'intégrité de la réserve ovarienne et augmente les capacités reproductives chez cette souris (Pelosi *et al.*, 2013). Au contraire, lorsque FOXO3A est phosphorylé par AKT, il est essentiellement localisé dans le cytoplasme, est inactif et perd son rôle de répression de l'activation folliculaire. En effet, dans les ovaires des souris *Foxo3a*^{-/-}, les follicules primordiaux, une fois formés, entrent massivement en croissance ce qui conduit rapidement à une déplétion folliculaire totale, une IOP et une infertilité (Castrillon *et al.*, 2003; John *et al.*, 2008).

Régulation extra-ovocytaire de la voie de signalisation PI3K

La voie de signalisation PI3K intra-ovocytaire est donc essentielle au contrôle de la croissance folliculaire. Cependant, en amont, les signaux extra-ovocytaires gouvernant l'activation ou l'inactivation de cette voie ne sont pas entièrement connus.

De nombreuses études ont montré que la voie de signalisation PI3K était une des cibles du couple Kit-Ligand (KIT-L)/c-KIT. c-KIT est un récepteur situé à la surface des ovocytes, alors que KIT-L est produit par les cellules de la granulosa. L'étude de modèles animaux ainsi que des expériences *in vitro* ont révélé que l'interaction de KIT-L avec son récepteur est fondamentale pour de multiples aspects du développement ovocytaire et folliculaire : mise en place des CGPs, activation des follicules primordiaux, survie des ovocytes, croissance et prolifération des cellules de la granulosa ... (Driancourt *et al.*, 2000). Récemment, il a été montré, *in vitro*, que le traitement par KIT-L d'ovaires de souris nouveau-nées augmentait la proportion de FOXO3 dans le cytoplasme des follicules primordiaux ce qui est en faveur du rôle du couple KIT-L/c-KIT dans la régulation de l'activation de ces follicules (Ezzati *et al.*, 2015)

Par ailleurs, de nombreux facteurs de croissance, tels que PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), KGF (Keratinocyte Growth Factor), VEGF (Vascular-Endothelial Growth Factor) entraînent également l'activation de la voie de signalisation PI3K. Ces différents facteurs pouvant s'exprimer dans l'ovocyte ou les cellules de la granulosa, leur rôle potentiel comme facteurs régulant le recrutement folliculaire a été suggéré (Adhikari and Liu, 2009).

b. Facteurs de transcription ovocytaires

NOBOX est un facteur de transcription exprimé, chez la souris, par les ovocytes depuis le stade primordial jusqu'au stade pré-antral. L'inactivation de ce gène chez la souris entraîne une IOP par une perte accélérée des ovocytes après la naissance et un arrêt de la transition entre le follicule primordial et le follicule primaire (Rajkovic *et al.*, 2004). Chez la femme, des mutations de *NOBOX* ont été retrouvées chez environ 6% des femmes présentant une IOP, faisant de cette mutation une des principales causes génétiques autosomiques d'IOP (Bouilly *et al.*, 2011, 2015). SOHLH1 et 2 (Spermatogenesis and oogenesis-specific Helix Loop factors 1 et 2) sont des facteurs de transcription exprimés par les ovocytes des follicules primordiaux et primaires. Comme pour NOBOX, une inactivation de ces gènes chez la souris induit un blocage de la folliculogénèse au stade primordial et une perte folliculaire (Pangas *et al.*, 2006) et des variants de ces deux gènes ont été mis en évidence chez des femmes présentant une IOP (Qin *et al.*, 2014). Enfin, de la même manière, il a été montré que LHX8 (Lim Homeobox 8), une autre protéine à homéodomaine, était également impliquée dans les stades précoces de la folliculogénèse (Choi *et al.*, 2008).

c. Voie de signalisation TGF β

La superfamille du TGF β est constituée de protéines (hormones, facteurs de croissance) ayant diverses fonctions dans le développement et l'homéostasie tissulaire. Ces protéines se lient à des récepteurs de type sérine/thréonine kinase qui phosphorylent et activent les facteurs de transcription SMAD intracellulaires. Dans l'ovaire, plusieurs facteurs de cette famille sont exprimés par les cellules somatiques ou les ovocytes à divers stades du développement. Des modèles murins ainsi que des études fonctionnelles réalisées *in vitro* ont démontré les rôles physiologiques intra-ovariens de ces facteurs dans plusieurs aspects de la fonction ovarienne: du développement folliculaire initial à la stéroïdogénèse mais aussi dans la communication inter-cellulaire ou la maturation ovocytaire (Chang *et al.*, 2016). Plusieurs membres de cette famille sont des régulateurs intra-ovariens cruciaux de la folliculogénèse (Pangas, 2012). Sécrétés par les cellules de la granulosa, les cellules de la thèque ou les ovocytes, ces facteurs sont un bon exemple de coopération cellulaire permettant la régulation de l'entrée en croissance des follicules primordiaux.

Parmi ceux-ci les BMP4 et BMP7, exprimés par les cellules somatiques de la thèque ou de la granulosa, semblent activer l'entrée en croissance des follicules. Les cellules de la granulosa des follicules en croissance sécrètent l'hormone Anti-Müllerienne (AMH) qui, au contraire, semble

bloquer l'activation de ces follicules (Knight and Glister, 2006). Cette hormone étant au cœur de sujet de ce mémoire de thèse, un chapitre spécifique lui est consacré plus loin dans ce manuscrit. D'autres hormones peptidiques appartenant à cette famille, comme les activines A et B et la follistatine interviennent également dans la régulation des stades précoces de la folliculogénèse (Knight and Glister, 2006).

d. Autres facteurs exprimés ou sécrétés par les cellules de la granulosa

FOXL2

FOXL2 est un facteur de transcription, appartenant à la famille des forkhead comme les FOXO. Exprimé dans les paupières et l'ovaire des mammifères, il est impliqué non seulement dans la différenciation gonadique mais aussi dans les premières étapes de la croissance des follicules primordiaux. Chez la souris, *Foxl2* est exprimé dans les cellules de la granulosa des follicules primordiaux et son invalidation empêche la différenciation des cellules de la granulosa squameuses en cellules cuboïdales malgré une croissance ovocytaire conservée et accélérée (Schmidt *et al.*, 2004; Uda *et al.*, 2004). Ces résultats, retrouvés par deux équipes indépendantes, montrent que FOXL2 est un élément essentiel pour la transformation des cellules de la granulosa et qu'en absence de FOXL2 le pool des follicules primordiaux est prématurément activé mais sans différenciation des cellules de la granulosa, ce qui induit une déplétion précoce de la réserve ovarienne. Chez l'Homme, des mutations de ce gène sont à l'origine du syndrome de blepharophimosis ptosis epicanthus inversus (BPES) combinant anomalies oculaires et IOP chez la femme (Crisponi *et al.*, 2001). De manière intéressante, des variants de ce gène ont également été mis en évidence chez des femmes présentant une IOP non syndromique et dans certains cancers de l'ovaire chez la femme, ce qui montre son rôle central dans la physiologie ovarienne (Elzaiat *et al.*, 2017).

Hormones stéroïdiennes

L'administration d'œstradiol et de progestérone chez des rats nouveau-nés (entre 0 et 4 jours après la naissance) augmente la quantité des follicules primordiaux retrouvés dans leurs ovaires, suggérant que ces hormones jouent un rôle inhibiteur sur l'entrée en croissance des follicules de réserve chez le rongeur (Kezele and Skinner, 2003). Des expériences *in vitro* utilisant du cortex foetal de bovin traité avec des œstrogènes et de la progestérone donnent des résultats similaires (Yang and Fortune, 2008).

Les androgènes, sécrétés par les cellules de la thèque en collaboration étroite avec les cellules de la granulosa pourraient également avoir un impact sur l'entrée en croissance des

follicules primordiaux. L'analyse d'ovaires de singes prépubères, traités par des androgènes, met en évidence une activation folliculaire accélérée (Vendola *et al.*, 1998). Cette action activatrice de ce stéroïde sur l'initiation de la croissance folliculaire pourrait avoir lieu de manière directe *via* les récepteurs aux androgènes exprimés par les follicules primordiaux en transition. Ces données ont permis d'évoquer le rôle permissif des androgènes dans la physiopathologie du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) (Rice *et al.*, 2007).

e. Autophagie

L'autophagie est un processus non sélectif de dégradation lysosomale des protéines à longue durée de vie et des organelles. Il est très conservé au cours de l'évolution et représente un mécanisme de défense et de survie cellulaire par contrôle de l'homéostasie cellulaire. La découverte des gènes *Atg* (Autophagy related genes) a permis de mieux comprendre les bases moléculaires de l'autophagie, l'inactivation d'*Atg7* provoquant une inhibition de l'autophagie. Les souris invalidées pour *Atg7* spécifiquement dans l'ovocyte présentent une diminution drastique du nombre des follicules primordiaux à 6 mois ce qui est en faveur du rôle de l'autophagie dans la survie du stock de ces follicules de réserve (Gawriluk *et al.*, 2011).

f. Rôle des gonadotrophines

Le rôle de la FSH (Follicular Stimulating Hormone), sécrétée par les cellules gonadotropes hypophysaires, dans l'initiation de la croissance folliculaire a longtemps été débattu. Si des études anciennes ont suggéré que la FSH bloquait l'entrée en croissance des follicules, plusieurs arguments solides montrent que la FSH n'est pas, ou très peu impliquée dans ce processus: (i) les follicules primordiaux n'expriment pas le récepteur de la FSH ; (ii) chez la souris, le rat, le chat ou les babouins, l'initiation de la croissance folliculaire peut avoir lieu en absence de FSH ; (iii) chez les femmes mutées pour la sous-unité β de la FSH ou son récepteur les follicules peuvent atteindre le stade pré-antral (Alain Gougeon, 2013).

5. Conclusion

L'entrée en croissance des follicules primordiaux est finement régulée par de nombreux facteurs d'origine ovocytaire ou somatique (Figure 7). Cette étape est d'autant plus complexe que ces différents acteurs interagissent entre eux comme le montrent de nombreuses études réalisées chez la souris ou dans des modèles cellulaires *in vitro* (Bouilly *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2017). La connaissance de ces mécanismes a conduit au développement d'agonistes et d'antagonistes de ces molécules qui ont permis de confirmer ou mieux comprendre le rôle de chaque facteur (McLaughlin *et al.*, 2014; Schneider *et al.*, 2014). Elles peuvent également être utilisées à des fins thérapeutiques pour éviter la perte folliculaire ou au contraire activer l'entrée en croissance des follicules, en fonction des situations (Li *et al.*, 2010; Meirow *et al.*, 2015).

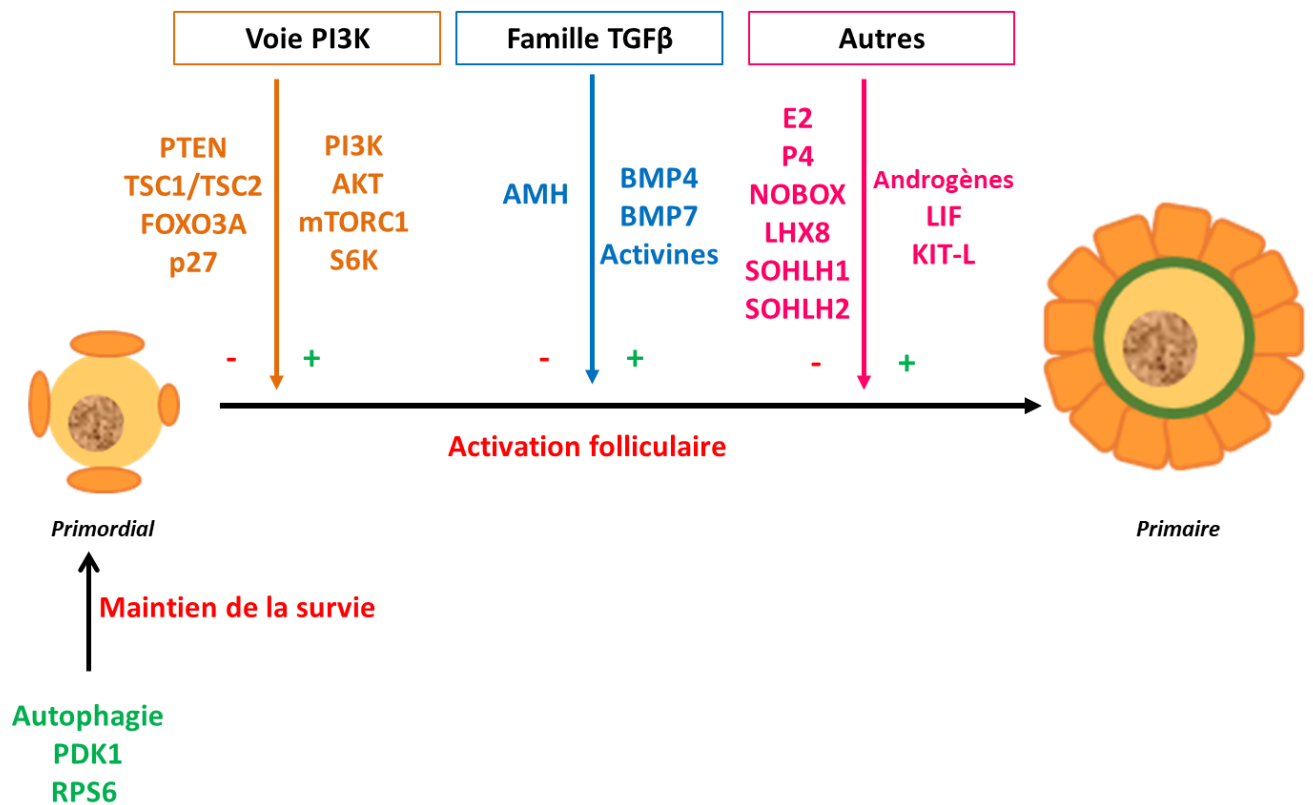


Figure 7. Principaux facteurs impliqués dans la régulation de l'activation des follicules primordiaux. Le stock des follicules de réserve est contrôlé tout au long de la vie reproductive par une balance entre des facteurs activant ou inhibant l'entrée en croissance des follicules primordiaux. Ces facteurs sont de natures diverses et variées. Un déséquilibre peut induire une déplétion précoce de ce stock et une IOP.

C. Croissance folliculaire basale : du follicule primaire au petit follicule antral

Après son activation, le follicule primordial peut entamer les différentes phases de la folliculogénèse. La première étape de croissance, dite «basale», démarre dès la vie fœtale chez la femme et quelques jours après la naissance chez la souris. Elle permet l'évolution du follicule primaire jusqu'au stade petit antral. Elle se traduit morphologiquement par une augmentation importante de la taille de l'ovocyte, une différenciation et prolifération des cellules somatiques folliculaires (cellules de la granulosa et de la thèque), et la formation d'une cavité liquidienne au cœur du follicule. La grande majorité des follicules débutant leur croissance entrera en atrophie à ce stade précoce de développement (Figure 1). Comme pour le recrutement initial, il existe une régulation fine et complexe, faisant intervenir essentiellement des acteurs locaux, dont une grande partie provient de l'ovocyte, qui est reconnu, par certains, comme le « chef d'orchestre » de la croissance folliculaires (Matzuk *et al.*, 2002).

1. Modifications morphologiques et fonctionnelles

C'est au début du développement folliculaire que l'ovocyte croît le plus et le plus vite. Entre le stade primordial et antral débutant, son diamètre passe environ de 40 μ m à 100 μ m chez la femme et de 14 μ m à 50 μ m chez la souris (Pedersen and Peters, 1968; Gougeon, 1996). Après, sa croissance sera beaucoup plus lente puisqu'il atteindra environ 140 μ m dans le follicule ovulatoire chez la femme et 70 μ m chez la souris. Par ailleurs, la zone pellucide constituée de glycoprotéines, indispensable à la poursuite du développement folliculaire se forme rapidement autour de l'ovocyte.

Cette croissance ovocytaire est associée à une multiplication et une différenciation des cellules de la granulosa qui deviennent cuboïdales. Quand plusieurs couches de cellules de la granulosa se sont formées, des sécrétions vont apparaître puis fusionner formant une cavité unique, l'antrum. Au moment de l'apparition de la cavité antrale, les cellules de la granulosa entourant l'ovocyte seront appelées cellules du cumulus oophorus alors que les cellules tapissant la cavité antrale formeront les cellules murales. Enfin, des cellules du stroma se différencient en cellules de la thèque qui se diviseront ensuite en une couche externe, qui semble indifférenciée et une couche interne qui, rapidement, va prendre l'aspect typique de cellules stéroïdiennes (Gougeon, 2010). Au cours de la croissance basale, les cellules de la granulosa sont encore peu différenciées. Elles n'expriment pas les enzymes nécessaires à la stéroïdogénèse ni le récepteur de la LH (Luteinizing Hormone). Cette différenciation cellulaire, qui s'opèrera *via* la FSH, est inhibée par de nombreux acteurs comme des facteurs de transcription (FOXO1) ou certains

facteurs de croissance (KGF, HGF) ou encore les IGFBP (Insulin Growth Factor Binding Protein) qui lient l'IGF et donc empêchent l'action de ce facteur de croissance (Monget and Bondy, 2000; Richards and Pangas, 2010). Cependant, les cellules de la granulosa développent tout de même de nouvelles fonctionnalités et commencent à sécréter diverses hormones peptidiques, comme l'AMH ou les activines et inhibines qui jouent un rôle clefs à plusieurs étapes de la folliculogénèse.

Par ailleurs, un réseau de communications entre les cellules germinales et somatiques se met en place dès le stade primaire. Il est formé par des canaux (ou jonctions gap) constitués principalement de connexines, dont les connexines 43 et 37, qui permettent des communications bi-directionnelles entre ces différentes cellules et le passage de nutriments, messagers secondaires ou métabolites (Conti, 2010). Enfin, les follicules qui sont vascularisés deviennent directement exposés aux facteurs sanguins circulants, dont les gonadotrophines.

2. Durée

Chez la femme, le temps nécessaire au follicule activé pour atteindre le stade pré-antral semble être d'environ 120 jours, 70 jours supplémentaires étant nécessaires à ces follicules pour atteindre le stade petit antral. Ces données, obtenues à partir d'étude histologique d'ovaire de femme dans les années 1990s (Gougeon, 1996) sont confirmées par des observations plus récentes comme la présence de petits follicules antraux 6 mois après une xénogreffe de cortex ovarien humain chez la souris (Li *et al.*, 2010) ou la visualisation de follicules antraux à l'échographie 3.5 à 6 mois après la greffe de cortex humain préalablement congelé avant chimiothérapie (Donnez and Dolmans, 2015).

De la même manière, ce temps nécessaire à la croissance folliculaire basale a été estimé par des études histologiques chez des souris de 28 jours (Pedersen, 1970). Un follicule, une fois activé, met environ 14 jours à atteindre le stade préantral puis 2 jours de plus pour atteindre le stade de follicule antral précoce, dernière classe folliculaire visualisée chez ces souris encore impubères (Figure 8).

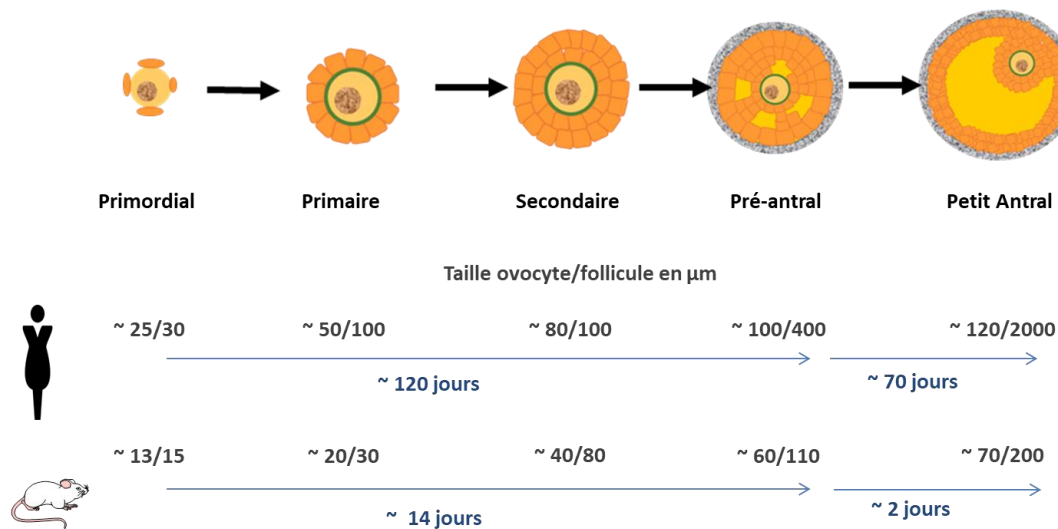


Figure 8. Durée de la croissance folliculaire basale chez la femme et chez la souris. Les différentes étapes sont identiques chez la femme et la souris, mais cette phase ne dure que 16 jours chez la souris alors que le temps nécessaire au follicule primaire pour atteindre le stade petit antral est de plus de 3 mois chez la femme. Elle est marquée par une croissance très importante de l'ovocyte.

3. Régulation

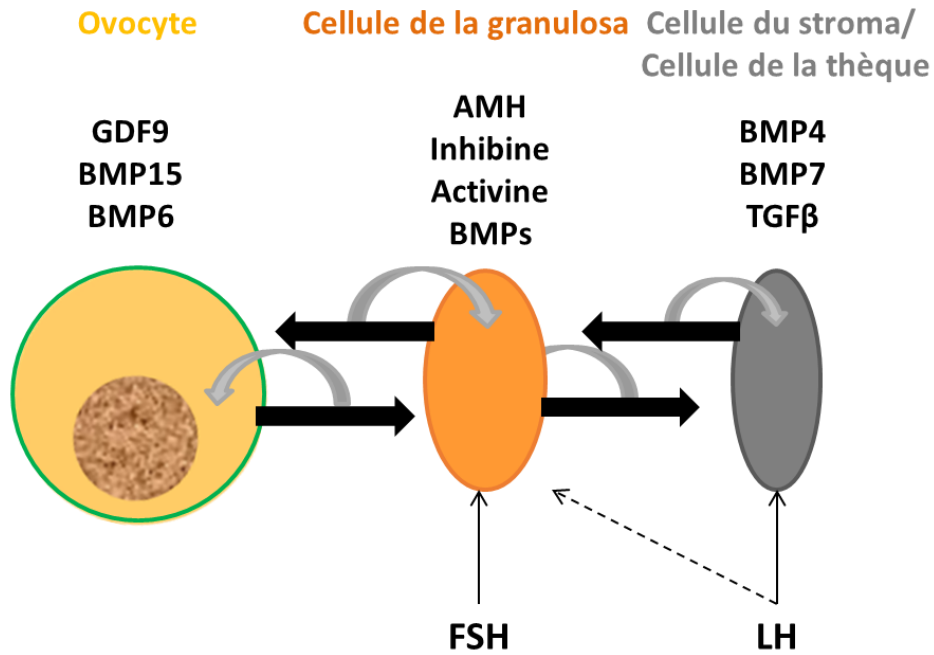
a. GDF9 et BMP15

GDF9 et BMP15 sont deux facteurs ovocytaires, appartenant à la famille du TGF β jouant un rôle majeur tout au long de la folliculogénèse, dès les premières étapes de la croissance folliculaire. Les souris femelles *Gdf9*^{-/-}, comme les brebis présentant des mutations inactivatrices de ce même gène, sont infertiles avec un arrêt du développement des follicules au stade primaire (Carabatsos *et al.*, 1998; Nicol *et al.*, 2009). De manière intéressante, les cellules de la granulosa des ovaires de ces souris sont anormales avec une augmentation de l'expression de *Kit-L* et une absence de formation de cellules de la thèque. Des études complémentaires récentes, évaluant l'origine et la différenciation des cellules de la thèque ont confirmé ce rôle essentiel de GDF9 dans la croissance folliculaire chez la souris (Liu *et al.*, 2015). Ainsi, une coopération entre KIT-L et GDF9, possible grâce aux communications inter-cellulaires entre les différentes cellules folliculaires permet un développement coordonné de l'ovocyte et des cellules somatiques l'entourant (Conti *et al.*, 2006; Gougeon, 2010).

Les rôles de BMP15 au cours de la folliculogénèse sont nombreux. En effet, il a été montré que cette protéine agissait non seulement sur la croissance et la maturation du follicule après son activation, mais aussi sur la régulation de la sensibilité des cellules de granulosa à la FSH, la détermination du nombre de follicules qui ovuleront, l'apoptose des cellules de la granulosa ou la

maturation ovocytaire (Persani *et al.*, 2014). L'importance de BMP15 dans le développement folliculaire précoce a d'abord été mis en évidence chez la brebis, les animaux présentant une mutation perte de fonction homozygote de *Bmp15* présentant une IOP avec un blocage de la folliculogénèse au stade au stade primaire (Galloway *et al.*, 2000; Martinez-Royo *et al.*, 2008). Ce phénomène met en évidence le rôle essentiel de BMP15 dans le contrôle de la croissance folliculaire précoce. L'utilisation de BMP15 recombinante a permis d'affirmer ce rôle potentialisateur sur la prolifération des cellules de la granulosa chez le rat, la femme et la brebis (Otsuka *et al.*, 2000; McNatty *et al.*, 2005). Enfin, des mutations de *BMP15* ont été identifiées en association avec des aménorrhées primaires ou secondaires dans des cohortes de femmes présentant une IOP (Persani *et al.*, 2014).

Cependant, de manière intéressante, la folliculogénèse de la souris invalidée pour ce gène n'est pas complètement altérée, ces souris présentant une hypofertilité (Yan *et al.*, 2001). Par ailleurs, lorsque qu'une mutation est présente à l'état hétérozygote chez la brebis, elle induit une augmentation des taux d'ovulation et de la taille des portées (Galloway *et al.*, 2000). Ce phénotype variable a été retrouvé dans plusieurs études (Mulsant *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001; Martinez-Royo *et al.*, 2008; Persani *et al.*, 2014). Une collaboration fonctionnelle entre BMP15 et GDF9 permettrait d'expliquer cette différence de phénotype. L'existence d'hétérodimères BMP15-GDF9 ou la coopération synergique entre des homodimères de BMP15 et de GDF9 permet de mieux comprendre cette étroite collaboration (Persani *et al.*, 2014). Celle-ci a été mise évidence chez les rongeurs, la brebis ou la femme. Ces deux facteurs ovocytaires interagissent donc de manière étroite entre eux et avec d'autres membres de la famille du TGF β , sécrétés par les cellules de la granulosa ou par les cellules stromales, mettant en évidence l'importance des communications intercellulaires pour le bon développement folliculaire (Figure 9).



Adapté de Knight et al, 2006

Figure 9. Membres de la famille TGFβ impliqués dans la croissance folliculaire. De nombreux facteurs de la famille des TGFβ sont sécrétés par les différents types cellulaires constituant les follicules. Ils interagissent entre eux afin de réguler la croissance du follicule. Cette collaboration met en évidence l'importance du dialogue entre l'ovocyte et les cellules somatiques au cours de la folliculogénèse.

b. Gonadotrophines

On a longtemps pensé que les petits follicules étaient insensibles à la FSH malgré la présence de récepteurs de la FSH dès les stades précoces du développement folliculaire (Meduri *et al.*, 2003), leur vascularisation ou la proximité des facteurs sanguins circulants. En effet, en absence de FSH biologiquement active (souris invalidée pour la *Fsh* ou son récepteur, mutation de *FSHβ* ou du récepteur de FSH chez la femme) ou lorsque la sécrétion de FSH est quasiment nulle (hypogonadisme hypogonadotrope profond, enfance avant la puberté), la folliculogénèse peut se dérouler au moins jusqu'au stade petit antral (Adhikari and Liu, 2009).

Cependant, de nombreuses études ont établi que la FSH jouait un rôle majeur lors la croissance folliculaire précoce. Par exemple, chez des rongeurs ne sécrétant plus de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) (suite à des traitements médicamenteux ou chirurgicaux), la folliculogénèse peut se dérouler jusqu'au stade petit antral mais les follicules sont moins nombreux et de moins bonne qualité par rapport aux contrôles, laissant supposer que la folliculogénèse n'est pas abolie mais altérée. Ces données sont confirmées par le fait qu'un traitement par de la FSH recombinante restaure un aspect et un nombre normal de follicules pré-

antraux (Alain Gougeon, 2013.). Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence une action synergique entre la FSH et les acteurs locaux, comme GDF9 ou BMP15, les facteurs de croissance tels que KGF ou même les stéroïdes, indispensables au bon déroulement de la croissance folliculaire basale (Guéripel *et al.*, 2006). En conclusion, si les premières étapes de la folliculogénèse peuvent se dérouler en absence de FSH grâce aux facteurs locaux, il semble que ce processus soit moins efficace qu'en présence de FSH. Cette phase de croissance est donc sensible à la FSH, mais non entièrement dépendante de cette hormone hypophysaire (McGee and Raj, 2015)

D. Croissance folliculaire terminale et ovulation

1. Différentes étapes : du recrutement folliculaire à l'ovulation

La dernière phase de la folliculogénèse démarre à la puberté avec la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires (FSH et LH) sous le contrôle de la sécrétion pulsatile de la GnRH hypothalamique. Elle commence par le recrutement d'un certain nombre de petits follicules antraux qui, à la place de mourir par atrophie à ce stade de développement, vont continuer à se développer et à se différencier. La FSH joue un rôle majeur dans ce processus. Elle agit sur son récepteur situé à la membrane des cellules de la granulosa et permet la différenciation, la maturation et la prolifération de ces dernières. Ce phénomène aboutit à la formation d'une cohorte de petits follicules antraux sensibles à la FSH, mesurant environ 5mm chez la femme et 300µm chez la souris, parmi lesquels un ou plusieurs follicules, en fonction des espèces, sera sélectionné. Ce dernier poursuit sa maturation, ses cellules de la granulosa se multiplient et acquièrent la machinerie enzymatique nécessaire à la sécrétion d'œstradiol qui sera de plus en plus importante. Dans un premier temps, l'œstradiol exerce un rétrocontrôle négatif sur les sécrétions hypothalamo-hypophysaires entraînant une baisse de la FSH circulante. Le (ou les) follicule sélectionné est dit dominant car il est capable de poursuivre sa croissance malgré la diminution progressive de la FSH alors que les autres follicules recrutés entrent en atrophie. Les mécanismes précis de la sélection puis de la dominance folliculaire sont encore mal connus.

Dans un second temps, la maturation pré-ovulatoire des cellules de la granulosa du follicule dominant se caractérise par l'acquisition des récepteurs de la LH et par une augmentation de l'activité aromatasase. Ces événements permettent une élévation importante des œstrogènes, qui va entraîner un rétrocontrôle positif sur l'hypophyse, à l'origine du pic de LH et *a minima* de FSH, déclenchant l'ovulation (Hillier *et al.*, 1981). Ce phénomène correspond à l'expulsion du complexe cumulo-ovocytaire contenant un ovocyte capable de reprendre sa méiose et d'être fécondé. Les

cellules folliculaires restantes se transforment en corps jaune produisant essentiellement la progestérone. Cette hormone induit un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires. En absence de gestation, le corps jaune dégénère, la sécrétion de progestérone diminue ce qui entraîne une nouvelle augmentation de la FSH responsable du recrutement puis de la sélection folliculaire cyclique. La succession de ces événements correspond au cycle ovarien et se reproduit de manière cyclique, sauf en cas de grossesse. Parallèlement, les variations hormonales entraînent des modifications des différents organes cibles comme l'utérus ou la glande mammaire.

2. Particularités et différences chez la femme et la souris

Si les différentes étapes de la croissance terminale sont similaires chez tous les mammifères, des différences essentielles existent, concernant notamment le nombre de follicules sélectionnés ou la durée de chaque phase.

Chez la femme ce cycle est dit menstruel. Il dure 28 jours et permet l'ovulation, en règle générale, d'un seul ovocyte. La phase folliculaire, correspondant à la sélection puis la croissance et enfin l'ovulation d'un seul follicule dominant, s'étend sur 14 jours. Le pic de LH déclenchant l'ovulation se situe vers le 12^{ème} jour du cycle. Il est suivi d'une phase lutéale, durant également 14 jours, qui correspond à la durée de vie du corps jaune en absence de grossesse. Le recrutement folliculaire, débute en fin de phase lutéale du cycle précédent secondairement à l'augmentation de la FSH. Selon la théorie traditionnelle, une seule cohorte de petits follicules antraux est recrutée de manière cyclique à chaque cycle menstruel (Pache *et al.*, 1990). Cependant, une nouvelle théorie suggère qu'il existe de multiples vagues de recrutement, pouvant survenir à n'importe quel moment du cycle (Baerwald *et al.*, 2003). Cette hypothèse a d'abord été proposée chez l'animal, plusieurs vagues folliculaires ayant été observées à différents moments du cycle œstrien chez la génisse (Adams *et al.*, 2012). La combinaison des évaluations échographiques, hormonales et histologiques ont permis de retrouver des résultats identiques chez la femme (Vaiarelli *et al.*, 2017). Cependant, physiologiquement, une seule de ces multiples vagues permet le développement du follicule dominant et son ovulation. Les mécanismes régulant ces différentes vagues ne sont pas entièrement connus et certaines études suggèrent l'implication de marqueurs inflammatoires dans la régulation de ces vagues folliculaires (Vinatier *et al.*, 1995).

Chez les rongeurs, le cycle œstrien ne dure que 4 à 6 jours, et aboutit à l'ovulation de plusieurs follicules. Comme chez la femme, les cycles se succèdent toute l'année sans interruption saisonnière et sont régulés par un rythme intrinsèque hypothalamo-hypophysaire-ovarien pouvant être modulé par des facteurs environnementaux. Si la reproduction du rat a été particulièrement

bien étudiée et la durée des 4 phases (proestrus, estrus, metestrus et diestrus) bien définies, le cycle semble être un peu plus variable chez la souris, notamment en fonction des souches (Staley and Scharfman, 2005) (Figure 10). Le proestrus correspond à la phase folliculaire donc au recrutement puis à la dominance des follicules sélectionnés. Durant cette période, la sécrétion d'œstrogènes est de plus en plus importante aboutissant à un pic de LH et de FSH, responsable de l'ovulation et de la période de réceptivité sexuelle, c'est l'œstrus. Enfin, la période post-ovulatoire et la phase lutéale correspondent au metestrus puis diestrus. La fécondation et la gestation entraînent un diestrus prolongé. L'évaluation du cycle œstrien chez la souris est possible grâce à la réalisation de frottis vaginaux quotidiens où la composition cellulaire est spécifique à chaque phase du cycle et facile à observer.

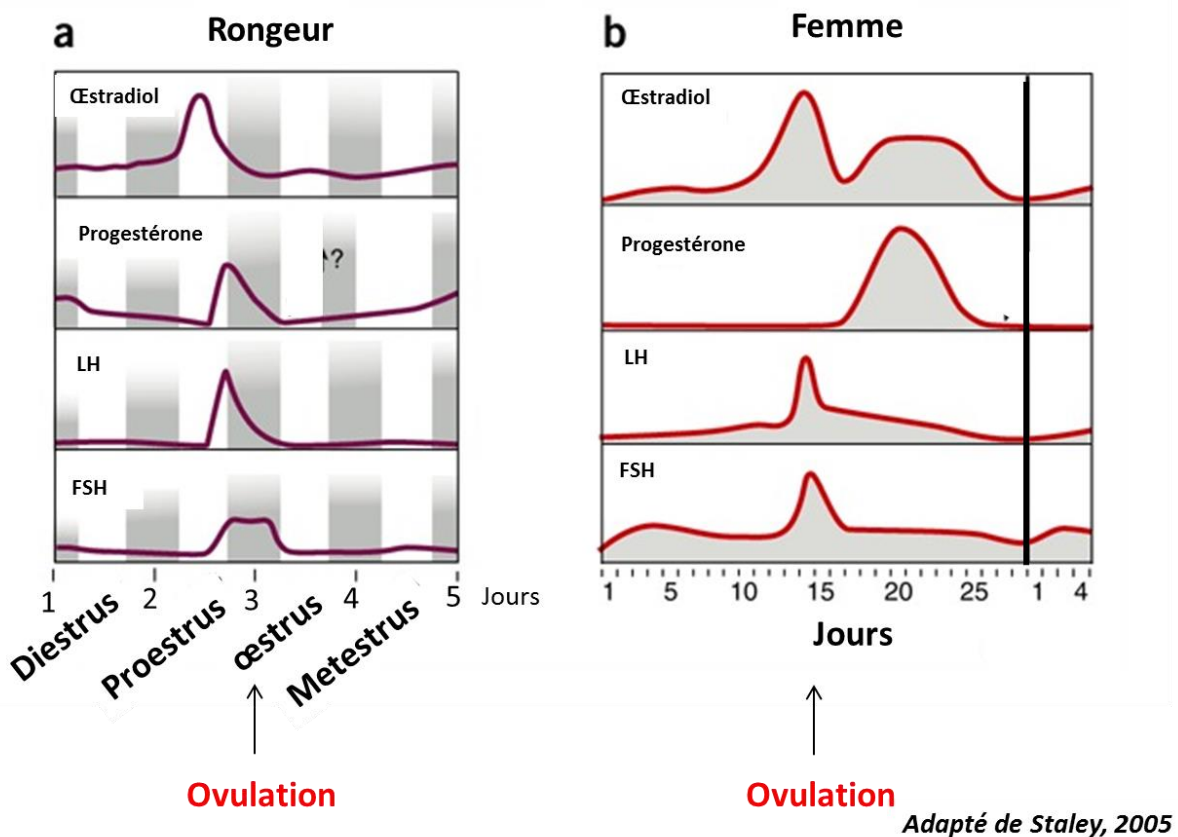


Figure 10. Comparaison du cycle œstrien des rongeurs et du cycle menstruel chez la femme. (a) Le cycle œstrien chez le rat dure 4 jours (les phases grises indiquent les périodes nocturnes) et est marqué par les fluctuations des hormones stéroïdes et des gonadotrophines hypophysaires. Chez la souris, le cycle œstrien est similaire mais moins bien caractérisé. Selon les données de la littérature la durée est plus variable (4 à 7 jours). (b) Le cycle menstruel de la femme dure environ 28 jours.

3. Régulation

Quelle que soit l'espèce, la FSH est le principal régulateur de ces dernières étapes de la folliculogénèse. Elle permet la stimulation de l'expression de l'aromatase par les cellules de la granulosa et par conséquent la sécrétion d'œstradiol. Elle active non seulement l'adénylate cyclase, induisant la production d'AMP cyclique (AMPc), mais aussi d'autres voies de signalisation, indépendantes de l'AMPc, comme les voies PI3K, RAS ou GSK3 (Richards and Pangas, 2010). L'action de la FSH est stimulée, ou inhibée, par de nombreux acteurs locaux tels que des membres de la famille TGF β , l'œstradiol, ou des facteurs de croissance. De nombreuses études ont montré l'importance, en particulier, du système IGF dans l'amplification de l'action de la FSH. En effet, IGF-1 active la voie de signalisation PI3K dans les cellules de la granulosa ce qui régule la prolifération, la différenciation et la survie de ces cellules en partie *via* l'expression de FOXO1 (Edson *et al.*, 2009). L'inactivation du gène *Igf-1* chez la souris a permis de mettre en évidence son rôle permissif de la réponse des cellules de la granulosa à la FSH en augmentant le taux des récepteurs à la FSH (Zhou *et al.*, 1997). Les inhibines et les activines, sécrétées par les cellules de la granulosa, inhibent ou activent, respectivement, l'action de la FSH sur ces cellules (Richards and Pangas, 2010).

La LH est le second régulateur majeur de la croissance terminale. En début de phase folliculaire, la LH exerce ses effets uniquement sur les cellules de la thèque interne, stimule les enzymes de la stéroïdogénèse (P450_{scc} et 17 α -hydroxylase) et permet la sécrétion des androgènes. Ces stéroïdes, synthétisés *in situ* vont être convertis en œstrogènes dans les cellules de la granulosa qui possèdent l'aromatase. Ainsi, il existe une coopération cellulaire permettant une stéroïdogénèse complète et fonctionnelle. En fin de croissance, les cellules de la granulosa du follicule pré-ovulatoire acquièrent des récepteurs de la LH qui agit alors en synergie avec la FSH pour augmenter la sécrétion d'œstrogènes. La décharge de LH, secondaire au rétrocontrôle positif des œstrogènes, est à l'origine de l'expulsion d'un ovocyte au stade de métaphase II compétent pour la fécondation et de la transformation fonctionnelle des cellules folliculaires restantes en corps jaune. Enfin, durant la phase lutéale, les enzymes de la stéroïdogénèse nécessaires à la fonction lutéale et à la production de progestérone (P450_{scc}, 3 β -hydroxystéroïde deshydrogénase, et 17 α -hydroxylase) sont activées et stimulées par la LH. Les effets de cette gonadotrophine s'exercent probablement par la stimulation de la voie des EGF (Epidermal Growth Factor). En effet, la LH induit l'expression de ligands du récepteur de l'EGF par les cellules de la granulosa murales qui permettent l'expansion du cumulus oophorus et la reprise de la méiose (Park *et al.*, 2004).

II. L'hormone anti-Müllérienne

A. Généralités

1. Historique

L'AMH (encore parfois appelée MIS pour « Müllerian Inhibiting Substance ») est une hormone peptidique dont le rôle physiologique princeps chez les mammifères a lieu au moment de la différenciation sexuelle. Elle a été découverte en 1947 par Alfred Jost qui a été le premier à suspecter l'existence d'un facteur spécifique de la différenciation sexuelle mâle pendant la vie embryonnaire (Josso, 2008). Au stade de gonade bipotentielle, l'expression du gène *SRY* chez le mâle induit une différenciation en testicule, capable de produire l'AMH et la testostérone. Ces deux hormones sont essentielles pour la formation des organes génitaux masculins. L'AMH, sécrétée par les cellules de Sertoli, induit la régression des canaux de Müller, alors que la testostérone, produite par les cellules de Leydig, permet le maintien des canaux de Wolff qui se différencieront ultérieurement en épididymes, canaux déférents, et vésicules séminales.

Ce n'est qu'en 1984 que Vigier *et al.*, ont découvert que l'AMH était également sécrétée chez la femme (Vigier *et al.*, 1984). Produite exclusivement par les cellules de la granulosa des petits follicules en croissance, elle est détectable, dans l'espèce humaine, de la 36^{ème} semaine de grossesse à la ménopause. Bien que libérée dans la circulation sanguine et détectable dans le plasma, son action est essentiellement ovarienne. Elle est impliquée dans la régulation du recrutement des follicules primordiaux puis de la croissance folliculaire (Visser *et al.*, 2006). Dans les années 1990s, des méthodes de dosages de l'AMH plasmatiques ont été mises au point.

Depuis lors, des modifications constantes sont réalisées dans le but d'améliorer la sensibilité et de diminuer les coefficients de variation des différents kits de dosage (Dewailly *et al.*, 2014). Depuis maintenant une quinzaine d'années, le dosage de l'AMH sérique a pris une place de plus en plus importante en pratique clinique chez l'Homme, comme en témoigne l'accélération du nombre de publications scientifiques sur l'utilisation de ce marqueur.

2. Caractéristiques fonctionnelles

L'AMH est une glycoprotéine homodimérique de la superfamille du TGF- β . Elle est produite sous forme d'un précurseur constitué de deux sous unités de masse moléculaire 70 kDa et stabilisées entre elles par deux ponts disulfures (Teixeira *et al.*, 2001). La protéolyse de cette protéine conduit à la formation d'une pro-région N-terminale de 55kDa et d'une région C-terminale mature de 12.5kDa. Les différents homodimères obtenus restent associés de manière non covalente, et c'est un complexe de 140 kDa qui est retrouvé dans la circulation sanguine. Si c'est la région mature C-terminale qui permet l'activité biologique de cette protéine, la pro-région N-terminale est nécessaire à son activité complète (Dewailly *et al.*, 2014).

Comme pour les autres membres du TGF- β , l'AMH exerce ses effets par l'intermédiaire de deux types de récepteurs transmembranaires de type sérine/thréonine kinase: un récepteur de type 2 spécifique (AMHR2) qui s'hérétodimérise avec des récepteurs de type I "activin receptor-like kinase" (ALK) (ALK2, ALK3 et ALK6) (Massagué and Chen, 2000; Josso *et al.*, 2001). La liaison entre le ligand et son récepteur de type 2 recrute et active le récepteur de type I ce qui va induire la phosphorylation d'effecteurs cytoplasmiques, les protéines SMAD (particulièrement les SMAD 1/5/8). Ces SMADs phosphorylées se lient à SMAD4 et forment un complexe qui, une fois transloqué dans le noyau, peut activer ou inhiber la transcription de gènes spécifiques (Figure 11).

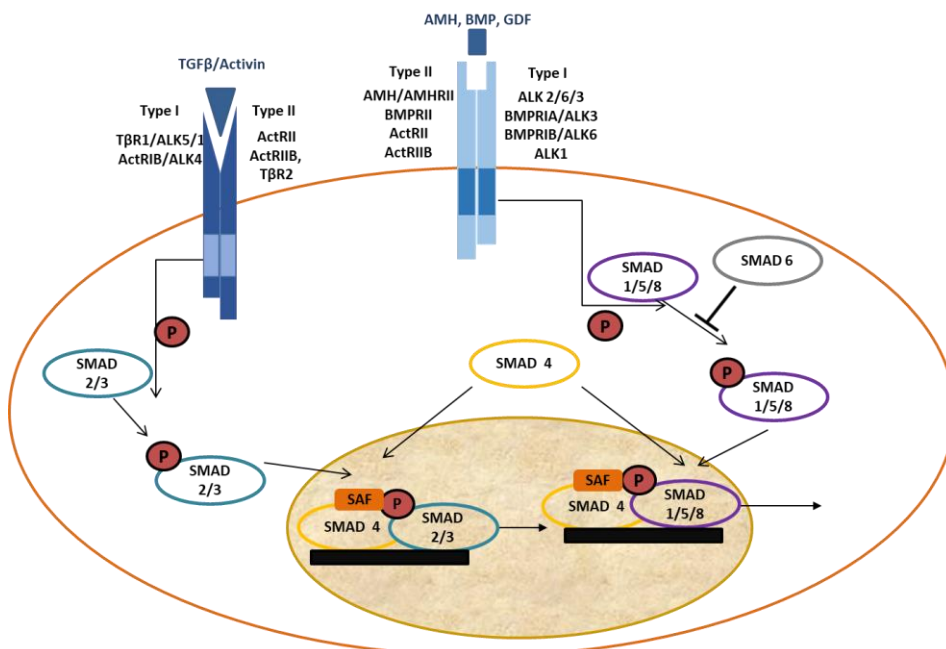


Figure 11. Représentation schématique simplifiée de la voie d'activation de la famille des TGF β . L'activation du récepteur transmembranaire de type II spécifique, par son ligand, recrute et active le récepteur de type I, entraînant la phosphorylation d'effecteurs des protéines SMAD, et particulièrement les SMAD 1/5/8. Ces SMADs phosphorylés se lient à SMAD4 pour former un complexe qui, une fois transloqué dans le noyau, peut activer ou inhiber la transcription de gènes spécifiques.

B. AMH dans l'ovaire : aspects fondamentaux

1. Profil d'expression de l'AMH par les cellules de la granulosa

L'AMH commence à être synthétisée par les follicules à partir du stade primaire, une fois qu'ils sont sortis de leur phase de quiescence. Chez les rongeurs l'AMH et son ARN messager ne sont pas présents dans les follicules primordiaux (Baarends *et al.*, 1995). Son expression ne cesse ensuite d'augmenter jusqu'au stade antral précoce où les follicules peuvent être sélectionnés pour la dominance (Durlinger *et al.*, 2002b). Chez la femme, son expression et sa sécrétion sont maximales dans les petits follicules antraux puis diminuent drastiquement pour devenir presque indétectables quand les follicules atteignent 8mm (Weenen *et al.*, 2004; Jeppesen *et al.*, 2013). S'il a été montré que pendant la phase de maturation folliculaire terminale, le follicule devient moins apte à exprimer l'AMH, celle-ci reste détectable au niveau des cellules du cumulus jusqu'au stade pré-ovulatoire (Hirobe *et al.*, 1992, 1994). Ainsi, au sein de chaque follicule, l'AMH est souvent exprimée de manière irrégulière, les niveaux des transcrits d'AMH étant 6 à 8 fois supérieurs dans les cellules du cumulus par rapport aux cellules murales dans les follicules des femmes ponctionnées lors des fécondations *in vitro* (FIV) (Grøndahl *et al.*, 2011; Merhi *et al.*, 2013). Enfin, l'AMH n'est pas exprimée par les follicules atreétiques ni par le corps jaune (Weenen *et al.*, 2004). Ce profil d'expression est similaire chez la femme (Weenen *et al.*, 2004), le rongeur (Baarends *et al.*, 1995), la chèvre (Bézar *et al.*, 1987) et le primate (Scalercio *et al.*, 2015).

2. Expression du récepteur spécifique de l'AMH

Chez la femme, AMHR2 est détecté dans les cellules de la granulosa, les cellules thécales, mais aussi dans l'utérus, l'endomètre, le sein, et l'hypothalamus suggérant une action autocrine, paracrine voire endocrine de l'AMH. Dans l'ovaire, AMHR2 est exprimé très tôt durant la vie foetale. Après la naissance, il est co-exprimé avec l'AMH dans les cellules de la granulosa des follicules en croissance. Son expression est nettement plus importante dans les cellules du cumulus par rapport à celles des cellules murales (Grøndahl *et al.*, 2011).

Chez le rat, l'expression d'*Amhr2* a été détectée dans les cellules de la granulosa des follicules primaires, pré-antraux, petit antraux mais pas dans les gros follicules antraux, les corps jaunes ni les follicules primordiaux (Baarends *et al.*, 1995). Cependant, chez la souris, la présence d'ARN messager de l'*Amhr2* a été mise en évidence dans les ovaires de souris dès 2 jours de vie et des études d'hybridation *in situ* ont montré l'expression du messager dans l'ovaire dès la naissance (Durlinger *et al.*, 2002a). Les follicules en croissance n'apparaissant chez les rongeurs

qu'à partir de 3-4 jours de vie, ces données suggèrent la présence du récepteur spécifique de l'AMH dans les follicules primordiaux. Cette hypothèse a été récemment confirmée par des études d'immunohistochimie chez la souris (Kano *et al.*, 2017). Des résultats similaires ont également été mis en évidence chez la femme (données personnelles non publiées, Alain Gougeon).

En 2016, une équipe française a posé l'hypothèse que l'AMH pouvait également agir directement sur les neurones hypothalamiques à GnRH, ces neurones exprimant le récepteur de l'AMH dès le développement précoce chez l'Homme comme chez le rongeur (Cimino *et al.*, 2016). De plus, cette équipe a montré, par des expériences d'électrophysiologie, que ces neurones étaient sensibles à l'AMH et qu'ils étaient capables de sécréter davantage de GnRH suite à des injections locales d'AMH recombinante (Cimino *et al.*, 2016). Cependant, ces résultats et leur implication potentielle en physiologie sont à confirmer.

3. Régulation de l'expression de l'AMH dans les cellules de la granulosa

Les facteurs initiant l'expression de l'AMH dans les follicules primaires ne sont pas encore connus alors que plusieurs acteurs semblent être impliqués dans sa régulation au cours de la folliculogénèse.

Tout d'abord, du fait de leur expression très précoce dans les différents types cellulaires des follicules, les BMPs pourraient être impliqués à la fois dans l'initiation de la transcription de l'AMH, puis dans le maintien de son expression dans les cellules du cumulus aux stades tardifs de la folliculogénèse. De plus, plusieurs études ont montré, chez les bovins ou la femme, que certaines BMPs stimulaient l'expression de l'AMH par les cellules de la granulosa avant qu'elles ne soient sensibles à la FSH (Ogura-Nose *et al.*, 2012; Pierre *et al.*, 2016; Poole *et al.*, 2016).

Par ailleurs, plusieurs études fondamentales sont en faveur d'une stimulation de l'expression et de la sécrétion d'AMH par la FSH (Winkler *et al.*, 2010; Lan *et al.*, 2013). L'augmentation de la sécrétion d'AMH, secondaire à des injections de FSH recombinante seule chez des femmes présentant un déficit gonadotrope congénital, est également en faveur d'une régulation positive de la FSH sur la sécrétion d'AMH (Bry-Gauillard *et al.*, 2017).

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* sont en faveur d'un rôle répresseur des œstrogènes sur la sécrétion d'AMH (Dewailly *et al.*, 2016). Cependant, il a été montré que l'impact de l'œstradiol sur la sécrétion d'AMH dépendait du type de récepteur aux œstrogènes (ER) exprimé par les cellules de la granulosa, il serait positif avec ER α (ESR1) et négatif avec ER β (ESR2). Cette hypothèse permettrait d'expliquer la forte diminution de l'expression de l'AMH au cours de la folliculogénèse, qui serait secondaire à l'augmentation de la production d'œstradiol, induisant une baisse d'AMH *via* le récepteur ER β majoritairement exprimé par les cellules de la granulosa en fin

de croissance (Grynberg *et al.*, 2012). Concernant les androgènes, des effets opposés sur l'expression de l'AMH ont été rapportés (Dewailly *et al.*, 2016).

D'autres facteurs, comme l'insuline ou la vitamine D ont également été proposés comme des régulateurs de l'expression de l'AMH (Seroka-Vanhove *et al.*, 2014).

Plusieurs données indiquent que la régulation du système AMH/AMHR2 diffère entre les femmes atteintes d'un syndrome des ovaires polykystiques et celles ne présentant pas de dysfonctionnement ovarien, ce qui pourrait expliquer, en partie, la physiopathologie de ce syndrome (Pierre *et al.*, 2013, 2017).

4. Rôles de l'AMH dans le fonctionnement ovarien

L'AMH est un acteur majeur au cours de la folliculogénèse. Des modèles ont permis de mettre en évidence le rôle de l'AMH dans l'inhibition de l'entrée en croissance des follicules primordiaux. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont pas encore clairement établis. Par ailleurs, l'AMH régule la sensibilité des cellules de la granulosa à la FSH (Figure 12).

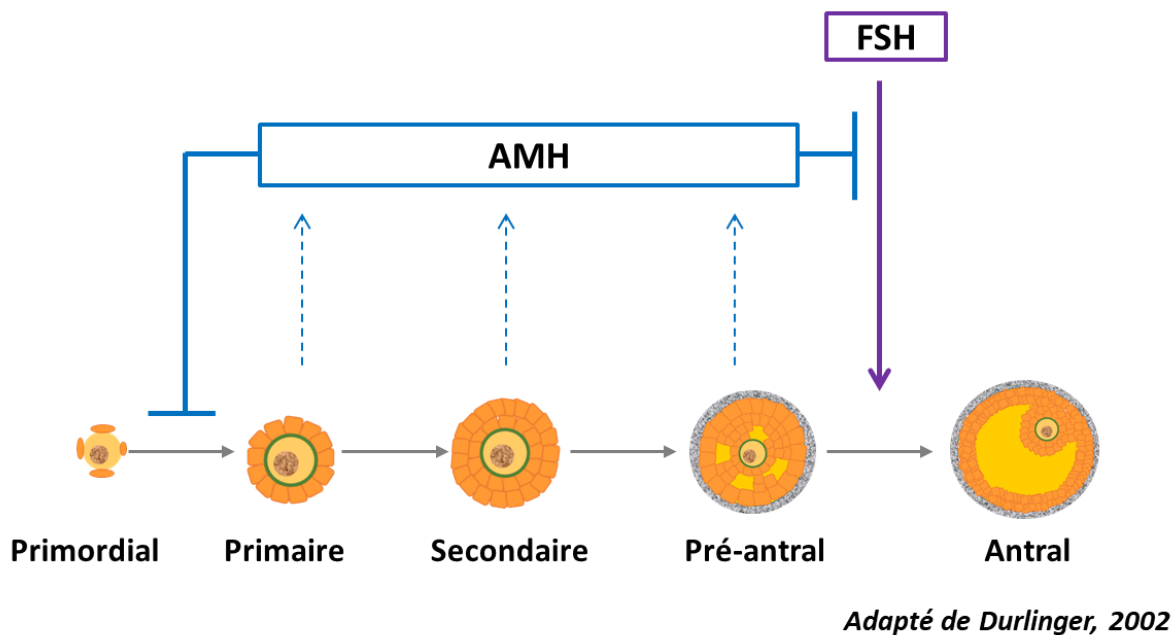


Figure 12. Profil de sécrétion de l'AMH et ses rôles au cours de la folliculogénèse. L'AMH est sécrétée par les follicules qui viennent de sortir du pool des follicules de réserve avant qu'ils ne soient éventuellement sélectionnés pour la dominance. Avant et après ces deux moments clés de la folliculogénèse, l'AMH n'est pas ou peu exprimée dans l'ovaire. Ces différents aspects sont en faveur d'un rôle important dans la régulation du nombre de follicules en croissance et dans leur sélection pour l'ovulation.

a. Recrutement des follicules primordiaux

La souris *Amh*^{-/-} a été générée en 1994 (Behringer *et al.*, 1994) mais l'analyse détaillée de la fonction ovarienne et de la folliculogenèse de la femelle n'a été réalisée que plus tard (Durlinger *et al.*, 1999; Visser *et al.*, 2007). Ces souris sont fertiles et ne présentent pas d'altération des cycles œstriens. L'analyse histologique des ovaires à divers stades de la vie reproductive a mis en évidence une augmentation du nombre des petits follicules antraux dès 25 jours de vie, une diminution de la quantité des follicules primordiaux à partir de 4 mois qui s'accroît au cours du temps. Vers 16-17 mois de vie, environ la moitié de ces souris cesse d'ovuler (Visser and Themmen, 2005). La souris hétérozygote *Amh* ^{+/-} présente un phénotype intermédiaire, ce qui indique que l'AMH inhiberait le recrutement des follicules primordiaux de manière dose-dépendante. Très récemment, l'augmentation du pourcentage de follicules primordiaux, suite à des injections intra-péritonéales quotidiennes d'AMH recombinante chez des souris sauvages pré- et post pubères a permis de confirmer ces résultats (Hayes *et al.*, 2016). Afin d'évaluer plus précisément l'action de l'AMH sur le stock des follicules primordiaux, des études *in vitro* ont été réalisées. Des ovaires de souris de 2 jours, contenant uniquement une grande quantité de follicules primordiaux, ont été mis en culture en présence ou non d'AMH recombinante (Durlinger *et al.*, 2002a). Après 2 ou 4 jours de culture en présence d'AMH, le nombre de follicules en croissance était diminué d'environ 40%, suggérant que cette hormone bloque l'activation des follicules primordiaux. Dans les ovaires cultivés en présence d'AMH, la diminution de l'expression de l'inhibine α , hormone peptidique sécrétée uniquement par les follicules ayant démarré leur croissance, confortait cette hypothèse. Des résultats similaires ont été retrouvés dans des cultures d'ovaires de rat (Nilsson *et al.*, 2007) et très récemment chez le bœuf (Yang *et al.*, 2017).

La culture *in ovo*, correspondant à une greffe d'ovaires sous la membrane chorioallantoïde d'embryons de poulet, est un modèle pertinent pour évaluer l'activation des follicules primordiaux. La culture *in ovo* de fragments de cortex d'ovaire bovin ou murin inhibe l'entrée en croissance de ces petits follicules, suggérant qu'un facteur sécrété par ces embryons bloque le recrutement folliculaire initial (Cushman *et al.*, 2002; Gigli *et al.*, 2005). Lorsque des fragments de cortex d'ovaires bovins sont greffés sous la membrane chorioallantoïde d'embryons de poulets gonadectomisés, l'entrée en croissance des follicules primordiaux n'est pas inhibée. Cette expérience suggère donc que ce facteur est sécrété par les gonades de ces embryons (Gigli *et al.*, 2005). La culture *in ovo* d'ovaires de souris *Amhr2*^{-/-} a permis de confirmer que le facteur responsable de cette inhibition était bien l'AMH, l'activation folliculaire n'étant pas bloquée (Gigli *et al.*, 2005).

Chez la femme, ces données sont plus controversées. Les résultats des études ayant évalué la culture de fragments de cortex en présence d'AMH recombinante sont contradictoires (Schmidt *et al.*, 2005; Carlsson *et al.*, 2006). Contrairement aux données rapportées dans les

différents modèles murins, Schmidt *et al.*, ont mis en évidence une activation des follicules primordiaux après 4 semaines de culture en présence d'AMH (Schmidt *et al.*, 2005). Un an après, une seconde étude vient contredire ces résultats, la proportion de follicules primordiaux étant augmentée après 7 jours de culture en présence d'AMH (Carlsson *et al.*, 2006). A ce jour, des mutations délétères de l'AMH ou de l'AMHR2 ont été identifiées chez des femmes présentant une IOP, confirmant ce rôle essentiel de l'AMH dans la régulation du stock folliculaire (Alvaro Mercadal *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). De plus, une relation entre l'âge à la ménopause et la voie de signalisation de l'AMH a été mise en évidence dans plusieurs études, venant conforter l'hypothèse du blocage de l'entrée en croissance des follicules primordiaux par l'AMH chez la femme (Voorhuis *et al.*, 2011; Braem *et al.*, 2013).

Si plusieurs éléments sont en faveur d'un rôle régulateur de l'AMH sur l'entrée en croissance des follicules primordiaux, les mécanismes mis en jeu n'ont pas été entièrement élucidés. Il peut être envisagé que l'AMH agisse directement sur les follicules primordiaux. Par ailleurs, dans un modèle de culture d'ovaires de rat, il a été mis en évidence que l'AMH inhibait l'expression du récepteur c-kit, ainsi que la synthèse de KIT-L, KGF et du récepteur 1 du bFGF empêchant ainsi l'action activatrice de ces différentes molécules sur l'entrée en croissance des follicules primordiaux (Nilsson *et al.*, 2007). Des études complémentaires ont confirmé que l'AMH régulait négativement l'expression de KIT-L dans les cellules de la granulosa humaines (Hu *et al.*, 2014). Plus récemment, il a été proposé que 2 micro-ARNs (miR-181a and miR-181b) seraient induits sous l'action de l'AMH et seraient impliqués dans la régulation du recrutement folliculaire initial (Hayes *et al.*, 2016).

b. Sensibilité à la FSH

L'AMH est également impliquée dans la régulation de la sensibilité folliculaire à la FSH et dans les mécanismes permettant la sélection du follicule dominant (Durlinger *et al.*, 2001). En effet, les souris *Amh*^{-/-} possèdent davantage de follicules en croissance que des souris contrôles, alors que les concentrations circulantes de FSH sont plus basses (Durlinger *et al.*, 2002b). De plus, la prolifération des cellules de la granulosa de follicules antraux de souris, induite par la FSH, est inhibée par l'addition d'AMH (Durlinger *et al.*, 2001). Par ailleurs, des études anciennes ont montré que l'AMH diminuait la synthèse de l'enzyme P450 aromatasase par les cellules de la granulosa alors que celle-ci est induite par la FSH (Vigier *et al.*, 1989; di Clemente *et al.*, 1992). De plus, dans les cellules de la granulosa lutéinisées humaines, l'AMH diminue l'expression du gène *CYP19a1* codant l'aromatase et en conséquence la production d'œstradiol (Grossman *et al.*, 2008).

Etat des connaissances

Enfin, plusieurs études ont mis en évidence une association inverse entre les concentrations intra-folliculaires d'AMH et celles d'œstradiol (Dewailly *et al.*, 2014).

c. Autres effets physiologiques de l'AMH

D'autres rôles de l'AMH, comme une action antiproliférative sur les différentes lignées de cellules ovariennes cancéreuses ont été rapportés (Masiakos *et al.*, 1999). Cette action antiproliférative a également été mise en évidence au sein d'autres organes exprimant le récepteur de l'AMH, comme les cellules mammaires, utérines ou endométriales (Kim *et al.*, 2014). Enfin, plusieurs travaux ont suggéré que l'AMH agirait comme un régulateur de l'atrésie folliculaire (Seifer and Merhi, 2014).

C. AMH en pratique clinique chez la femme

Depuis la découverte de l'AMH un grand nombre d'études ont été réalisées et le dosage sérique de ce peptide ovarien présente aujourd'hui un large éventail d'applications cliniques.

1. Evaluation des taux sériques d'AMH

Les dosages sériques d'AMH ont été développés dans les années 1990, initialement pour évaluer la fonction sertolienne chez le garçon, notamment pendant l'enfance. Les concentrations d'AMH sanguines étant largement inférieures chez la femme, il a fallu plusieurs années avant que des méthodes de dosages ultra-sensibles, utilisant deux anticorps monoclonaux différents, soient mises au point. A partir des années 2000, deux immuno-dosages ont été commercialisés et largement utilisés. Rapidement, ces kits ont été critiqués notamment du fait de la mauvaise stabilité de l'AMH induisant des coefficients de variation très importants. Ainsi, les valeurs obtenues n'étaient pas reproductibles en fonction des kits utilisés, rendant l'analyse des résultats difficiles (Dewailly *et al.*, 2014). Vers 2010, un nouveau kit de dosage (AMH GenII) a permis une amélioration importante des coefficients de variation et il est actuellement largement utilisé. Cependant, sa fiabilité et sa sensibilité peuvent être encore perfectionnées. De nouveaux systèmes de dosages automatisés ont alors été développés et sont actuellement quasiment systématiquement utilisés (Iwase *et al.*, 2018).

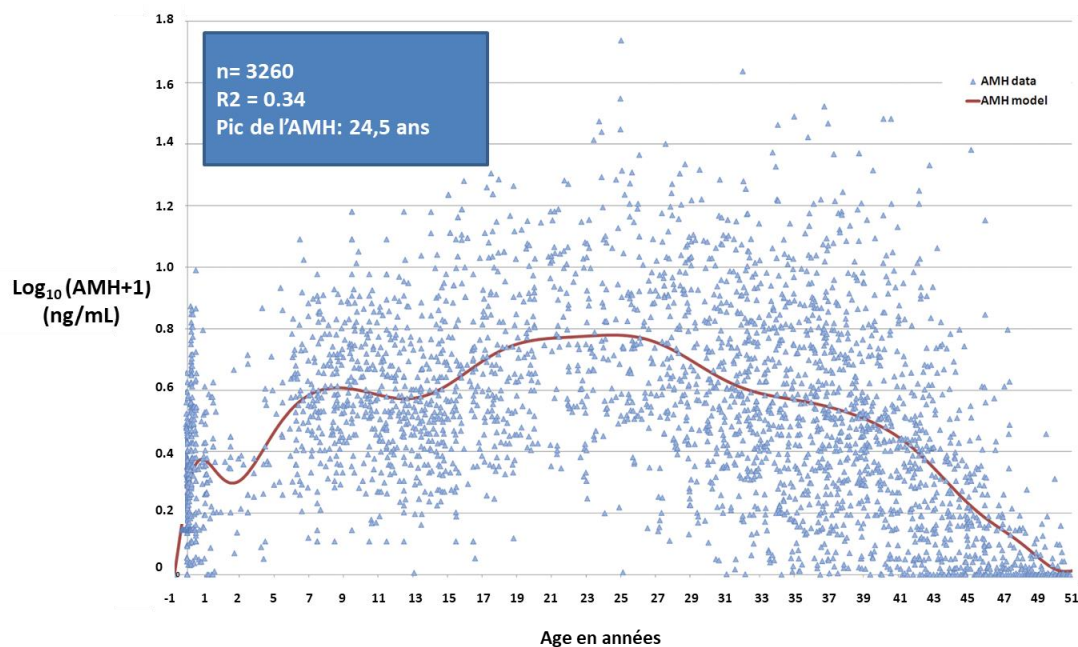
2. Marqueur de la réserve ovarienne

L'AMH est sécrétée par les petits follicules dès leur sortie de la phase de quiescence jusqu'au stade petit antral. Ce profil de sécrétion a permis de poser l'hypothèse que l'AMH reflétait la réserve ovarienne car le recrutement folliculaire initial semble être continu au cours de la vie reproductive et proportionnel à la quantité de follicules primordiaux restants dans les ovaires (Iwase *et al.*, 2016). D'un point de vue histologique, il a effectivement été montré que le dosage de l'AMH sérique était corrélé au nombre de petits follicules primordiaux chez la femme (Hansen *et al.*, 2011) ou chez la souris (Kevenaar *et al.*, 2006). De plus, il est clairement établi que le dosage de l'AMH sérique est fortement corrélé à l'évaluation échographique du nombre de petits follicules antraux (compte des follicules antraux (CFA)) qui est reconnu comme un autre excellent marqueur de la réserve ovarienne (Fanchin *et al.*, 2003; Pigny *et al.*, 2006).

Le dosage sérique de l'AMH présente de nombreux avantages par rapport aux marqueurs plus classiques de la réserve ovarienne, comme le dosage de la FSH corrélé à celui de l'œstradiol en début du cycle menstruel ou le dosage de l'inhibine B. Notamment, il est stable au cours du cycle menstruel, malgré quelques études rapportant des variations minimales et probablement non significatives en pratique clinique (Broer *et al.*, 2014). Ainsi, il est reconnu depuis plusieurs années comme le meilleur reflet de la réserve ovarienne (La Marca *et al.*, 2016) mais il n'est en rien un marqueur de fertilité ni de qualité ovocytaire (Steiner *et al.*, 2017). La sécrétion d'AMH étant contrôlée par de nombreux facteurs, les résultats de ce dosage doivent impérativement être interprétés en fonction du contexte clinique (Dewailly *et al.*, 2014).

3. Variations de l'AMH en fonction de l'âge

De multiples études ont évalué les concentrations sériques d'AMH en fonction de l'âge chez la femme. Les taux d'AMH sont détectables dans le sang en très faible quantité dès la naissance puis augmentent lentement pour atteindre un pic entre 16 et 25 ans avant de décliner progressivement jusqu'à la ménopause (Kelsey *et al.*, 2011) (Figure 13). Plusieurs études ont montré la capacité de l'AMH à prédire la transition vers la fin de la vie reproductive, les taux d'AMH devenant indétectables 3 à 5 ans avant le début de la ménopause (Iino *et al.*, 2013; Tehrani *et al.*, 2013).



Kelsey et al, 2011

Figure 13. Variations des concentrations d'AMH de la conception à la ménopause. Les résultats des dosages d'AMH chez plus de 3200 femmes ont permis de générer ce modèle de variations d'AMH au cours de la vie chez la femme. La ligne rouge est le modèle qui représente le mieux les 3260 données individuelles (triangles bleus). Ce modèle indique que 34 % des variations des concentrations sériques d'AMH sont liées à l'âge seulement. Dans ce modèle, la valeur maximale d'AMH est observée à 24,5 ans.

4. Utilisation en pratique clinique

a. Assistance Médicale à la Procréation

Il est aujourd'hui clairement établi que l'AMH est fortement corrélée au nombre d'ovocytes matures ponctionnés après stimulation de l'ovulation en vue d'une FIV. De nombreuses études ont mis en évidence que le dosage d'AMH sérique était le meilleur facteur prédictif de la réponse ovarienne à la stimulation pour FIV, qui peut être variable (Broer *et al.*, 2013). Ainsi, plusieurs nomogrammes, intégrant l'AMH, ont été développés afin d'optimiser le choix du protocole de stimulation et la dose de gonadotrophines de départ (La Marca and Sunkara, 2014). Cependant, si ces outils ont démontré leur intérêt pour diminuer le risque de mauvaises ou d'hyper-réponses (Papaleo *et al.*, 2016), leur utilité pour augmenter les chances de succès en FIV n'est pas établie. Le dosage d'AMH n'est pas corrélé aux chances de grossesses après FIV et des grossesses ont été décrites chez des patientes présentant des taux d'AMH quasiment indétectables (Pacheco *et al.*, 2017). L'âge reste aujourd'hui le seul et unique facteur prédictif de grossesse que ce soit spontanément ou en Assistance Médicale à la Procréation (AMP). Ainsi, un dosage d'AMH seul, sorti de son contexte, ne doit probablement pas être une cause d'exclusion des patientes des centres de FIV (Iwase *et al.*, 2018).

b. Diagnostic des dysovulations

Syndrome des ovaires polykystiques

Le SOPK est la première cause d'infertilité par anovulation et touche près de 10 % des femmes dans le monde (Norman *et al.*, 2007). Aujourd'hui, la définition du SOPK associe au moins 2 des 3 critères suivants (i) dysovulation, (ii) hyperandrogénie clinique ou biologique (iii) augmentation du nombre de follicules antraux dans les ovaires (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group, 2004). Les petits follicules antraux étant les principaux producteurs d'AMH (Jeppesen *et al.*, 2013), une élévation de ce peptide ovarien est très fréquemment présent chez ces patientes (Dewailly *et al.*, 2011). Ainsi, depuis plusieurs années, certains auteurs proposent que le dosage d'AMH fasse partie des différents critères diagnostiques de ce syndrome (Dewailly *et al.*, 2014). Cependant, toute la difficulté d'une telle démarche tient à la définition du seuil d'AMH devant être considéré comme pathologique (Quinn *et al.*, 2017). L'amélioration de la reproductibilité des techniques de dosage devrait permettre de définir ce seuil au cours des prochaines années.

Insuffisance ovarienne primaire

L'IOP est lié à un arrêt de la fonction ovarienne avant 40 ans. Elle est caractérisée par une aménorrhée primaire ou secondaire associée à un taux d'œstradiol circulant bas et un taux de FSH élevé (De Vos *et al.*, 2010). Cette pathologie étant souvent liée à une déplétion précoce du stock folliculaire, l'AMH sérique est quasiment indétectable dans la grande majorité des cas. Cependant l'AMH ne permet pas de prédire ni la cause (congénitale (anomalies génétiques ou chromosomiques, pathologies auto-immunes, idiopathiques) ou acquise (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie)) ni le mécanisme de l'atteinte de la réserve ovarienne (Visser *et al.*, 2012). Le principal intérêt du dosage de l'AMH dans ces situations pathologiques serait d'identifier les patientes potentiellement à risque, avant qu'elles ne développent une IOP. Ainsi, chez des patientes porteuses d'anomalies génétiques ou chromosomiques connues pour induire une IOP, comme le Syndrome de Turner, le taux d'AMH pourrait être prédictif de la réserve ovarienne et représenter une aide précieuse pour conseiller les patientes sur leur fertilité future (Visser *et al.*, 2012). Cependant, si une étude récente a montré que le dosage de l'AMH pouvait être prédictive d'une ménopause avancée (avant 45 ans), aucune étude n'a permis de mettre en évidence un lien entre le dosage de l'AMH sérique et une réelle IOP (Bertone-Johnson *et al.*, 2018).

Hypogonadisme hypogonadotrope

Pendant longtemps, la sécrétion d'AMH a été dite indépendante des gonadotrophines, FSH et LH. Cependant, plusieurs études récentes ont démontré que les taux d'AMH étaient significativement bas chez les femmes présentant une altération profonde de la sécrétion des gonadotrophines que ce soit congénitale (Bry-Gauillard *et al.*, 2017) ou secondairement à un traitement médicamenteux par des agonistes de la GnRH (Su *et al.*, 2013). Dans ces différentes situations, l'AMH ne représente pas un marqueur quantitatif fiable de la réserve ovarienne et son dosage ne permet pas non plus de diagnostiquer la cause de l'hypogonadisme hypogonadotrope qu'il soit partiel ou total, congénital ou acquis (Li *et al.*, 2011).

c. Préservation de la fertilité

Chez les femmes atteintes d'une pathologie altérant la réserve ovarienne, le dosage de l'AMH sérique au moment du diagnostic mais aussi au cours et au décours de la prise en charge présente de nombreux intérêts (Dunlop and Anderson, 2015) qui seront développés plus loin dans ce manuscrit.

III. Cancer et fertilité

Chez l'homme comme chez la femme, certains cancers peuvent induire, *per se*, une diminution de la capacité de reproduction se traduisant par une altération des paramètres spermatiques ou de la fonction ovarienne dès le diagnostic de la pathologie maligne (Dunlop and Anderson, 2015). Cependant, ce sont essentiellement les traitements utilisés en oncologie, comme la chimiothérapie ou la radiothérapie, qui exercent un effet délétère sur les gonades. A ce jour, plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer la gonadotoxicité des différentes thérapeutiques. Si ces mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés, il est clairement établi que la chimiothérapie peut induire une déplétion de la réserve ovarienne à l'origine d'une IOP et/ou d'une infertilité. Afin de pallier cette diminution de la fertilité, des techniques dites de Préservation de la Fertilité (PF) ont été développées et sont aujourd'hui disponibles en pratique courante.

A. Gonadotoxicité des chimiothérapies

A court terme, la chimiothérapie induit quasiment systématiquement une destruction des follicules en croissance, se traduisant par une aménorrhée transitoire survenant rapidement après les premiers cycles de chimiothérapie. Cet effet peut être transitoire comme en témoigne la possibilité d'un retour de cycle et d'une fonction ovarienne normale à distance des traitements (Roness *et al.*, 2016). En revanche, l'effet à long terme des traitements concerne l'atteinte, plus ou moins importante, du stock de follicules primordiaux. Il est irréversible et peut être à l'origine d'une IOP. La profondeur de la déplétion folliculaire est largement dépendante du type de molécule utilisée, modulée par la dose et divers facteurs dont l'âge ou la réserve ovarienne au moment des traitements. Une classification des agents chimiques en fonction de leur risque de gonadotoxicité a été proposée et est reportée dans le Tableau 1 (Donnez *et al.*, 2006).

Tableau 1. Classification des molécules de chimiothérapie en fonction de leur gonadotoxicité. D'après Donnez *et al*, 2006

Haut risque	Risque Modéré	Risque bas	Inderterminé
Cyclophosphamide	Cisplatine	Methotrexate	Irinotecan
Chlorambucil	Adriamycine	5-Fluorouracile	Imatimib
Melphalan	Paclitaxel	Vincristine	
Busulfan		Actinomycine D	
Ifosfamide		Bléomycine	
Procarbazine			
Thitepa			

Les mécanismes permettant d'expliquer la gonadotoxicité de ces différentes molécules ont été explorés dans divers modèles expérimentaux, allant de l'étude histologique d'ovaires de femme après chimiothérapie à la culture cellulaire en présence des métabolites actifs des agents chimiques. De très nombreuses études ont été réalisées et plusieurs hypothèses ont été évoquées (Bedoschi *et al.*, 2016). La théorie la plus communément admise repose sur une altération directe de l'ADN des ovocytes contenus dans les follicules primordiaux entraînant une atrophie folliculaire (Winship *et al.*, 2018). Plus récemment, il a été suggéré que certaines chimiothérapies pouvaient induire une entrée en croissance massive des follicules primordiaux et donc provoquer une déplétion accélérée de la réserve ovarienne. Cette théorie est appelée « effet burn-out » (Kalich-Philosoph *et al.*, 2013). Enfin, des analyses histologiques d'ovaires après chimiothérapie montrent des complications vasculaires endothéliales pouvant être à l'origine de fibrose tissulaire et par conséquent d'une altération du fonctionnement ovarien (Ben-Aharon *et al.*, 2012).

Une meilleure compréhension des mécanismes de gonadotoxicité est essentielle afin de développer des méthodes permettant de limiter l'impact de la chimiothérapie sur l'ovaire. Ces divers aspects faisant l'objet d'une partie importante de ce travail de thèse, la place de ces différentes hypothèses et leur implication sera développée puis discutée au fur et à mesure de ce manuscrit.

B. Conséquences de la gonadotoxicité sur la fonction ovarienne

Cliniquement, la traduction de l'altération de la fonction ovarienne est variable, allant de l'irrégularité menstruelle, l'aménorrhée transitoire, l'infertilité jusqu'à l'IOP, caractérisée par une aménorrhée persistante 2 à 5 ans après la fin des traitements.

La fonction ovarienne après cancer a pendant longtemps été évaluée par la reprise, ou non, des cycles menstruels à distance des traitements et de nombreux travaux ont utilisé l'aménorrhée chimio-induite (ACI) comme principal indicateur de la fonction ovarienne. Ces études ont rapporté que l'âge au moment du diagnostic était un facteur pronostique majeur, le risque d'ACI définitive étant plus important lorsque le traitement était administré après l'âge de 40 ans (*Tham et al., 2007a; Sukumvanich et al., 2010; D'Avila et al., 2015*). Le type de protocole de chimiothérapie semble également avoir un impact sur la survenue de l'aménorrhée, en particulier l'utilisation des taxanes ou des agents alkylants. Par ailleurs, il a été mis évidence que le risque d'ACI était corrélé à l'état de la réserve ovarienne avant traitement, les risques étant plus importants lorsque les taux d'AMH était plus bas (*Anders et al., 2008; Anderson and Cameron, 2011; D'Avila et al., 2015*). A l'inverse, lorsque le taux d'AMH est élevé avant la chimiothérapie, les risques de présenter une altération profonde de la réserve ovarienne au décours des traitements sont diminués (*Shandley et al., 2018*). Cependant, l'ACI est un très mauvais indicateur des chances de grossesse après guérison et s'il reflète imparfaitement la fonction ovarienne, il n'est pas du tout un marqueur fiable du stock de follicules de réserve. Les marqueurs classiques de la fonction ovarienne, comme le dosage de la FSH en début de cycle en association avec celui de l'œstradiol sont également peu sensibles pour évaluer la fertilité et la réserve ovarienne et sont peu utilisés dans le suivi des femmes après cancer.

Depuis quelques années, la gonadotoxicité des chimiothérapies est plus largement évaluée par les marqueurs quantitatifs du statut folliculaire ovarien, comme le compte des follicules antraux estimé par échographie et surtout le dosage de l'AMH sérique (*Dunlop and Anderson, 2015*). En effet, il semble que l'AMH à distance des traitements reste un marqueur quantitatif fiable de la réserve ovarienne y compris après cancer (*Anderson, 2011*) et plusieurs travaux ont confirmé qu'un antécédent de chimiothérapie représentait un facteur de risque accru d'altération de la réserve ovarienne (*Bedoschi et al., 2016*). De manière intéressante, de plus en plus d'études ont réalisé un suivi longitudinal des concentrations sériques d'AMH au cours et au décours de la prise en charge d'un cancer. Elles ont montré que si l'AMH était quasiment indosable au cours du traitement, une augmentation à distance était possible (*Hamy et al., 2014; Peigné and Decanter, 2014; Dezellus et al., 2017*). Cette notion récente, qui nécessite d'être confirmée par de plus larges

études, est particulièrement importante dans l'interprétation des résultats et dans l'information à délivrer aux patientes.

C. Fertilité après cancer

A ce jour, il n'existe pas de facteurs permettant de prédire la fertilité après cancer. Si l'AMH est un bon reflet de la réserve ovarienne, ce n'est pas un facteur prédictif de fertilité, des grossesses ayant été rapportées après cancer malgré un taux d'AMH indétectable (*Hamy et al., 2016*).

Les indicateurs les plus objectifs de la fertilité après cancer seraient *in fine*, les taux de grossesses cliniques et de naissances d'enfants vivants chez les patientes jeunes guéries d'un cancer. En effet, il est maintenant clairement établi que la survenue d'une grossesse chez une patiente guérie d'un cancer du sein, n'a pas de conséquence ni sur la survie ni sur le risque de récurrence (*Azim et al., 2013*). En revanche, si une grossesse après guérison d'un cancer du sein, quel que soit le statut hormonal, n'est pas contre-indiquée le délai recommandé avant la conception n'est pas clairement établi. L'autorisation pour débuter une grossesse doit être délivrée lors d'une concertation multidisciplinaire. Elle dépend notamment du pronostic de la patiente ou de l'indication à une hormonothérapie. De ce fait, ces grossesses doivent être programmées puis suivies de manière rapprochée.

L'évaluation des taux de grossesses à distance d'un cancer est particulièrement difficile car elle nécessite un suivi des patientes au long cours, sur plusieurs années voire décennies. Certaines études ont rapporté une incidence de grossesses après cancer particulièrement faible, entre 3 et 8% chez les femmes de moins de 45 ans (*Blakely et al., 2004; Oven Ustaalioglu et al., 2011*). Une méta-analyse récente a rapporté et analysé les grossesses décrites chez les femmes en âge de procréer, présentant un antécédent de cancer du sein (*Gerstl et al., 2018*). Près de 3.000.000 femmes jeunes ont été incluses dans cette méta-analyse et environ 21% de ces patientes ont mené une grossesse à terme. Les auteurs estiment qu'au total, les chances de grossesses chez les survivantes d'un cancer du sein sont diminuées d'environ 40% par rapport à la population générale. Il est intéressant de noter que d'autres études, certes anciennes, rapportent moins de 5% de chances de concevoir dans ce type de population. La prise en charge précoce, l'absence de chimiothérapie ou les tumeurs non hormono-sensibles diminueraient de manière moins importante la fertilité de ces patientes. Cependant, ces résultats sont à interpréter avec précaution car il n'y a que très peu de données concernant le mode d'obtention de ces grossesses qu'elles soient spontanées, obtenues après AMP ou même après don d'ovocytes. Par ailleurs, le taux de naissances d'enfants vivants après AMP est également largement altéré, lorsque la stimulation est

réalisée à distance des traitements (Barton *et al.*, 2012). Enfin, les chances de grossesses après utilisation de gamètes cryoconservés seront rapportées plus loin dans ce manuscrit.

Afin d'estimer au mieux la fertilité après cancer, une évaluation du projet conceptionnel de ces femmes est primordial. S'il a été montré que 40 à 50% des femmes désirent fonder une famille en fin de traitement pour cancer du sein (Azim *et al.*, 2011), cette notion est rarement rapportée dans les études évaluant la fertilité post cancer. La fertilité après guérison est devenue un élément essentiel dans la qualité de vie des patientes après cancer (Assi *et al.*, 2018) et la prédire voire essayer de la préserver sont devenus des enjeux majeurs dans la prise en charge de ces femmes jeunes.

D. Préservation de la Fertilité

1. Historique et cadre légal en France

Depuis plusieurs années, des consultations spécialisées dites d'oncofertilité se sont largement développées et doivent maintenant faire partie intégrante du parcours de soin des patientes jeunes atteintes de cancer (Martinez and International Society for Fertility Preservation-ESHRE-ASRM Expert Working Group, 2017). Plusieurs techniques de PF, visant à cryoconserver des gamètes ou à préserver les capacités reproductives sont aujourd'hui disponibles et d'autres sont en cours de développement (Sonigo *et al.*, 2015; Donnez and Dolmans, 2017). En France, ces démarches s'inscrivent, depuis 1994, dans les différentes lois de bioéthique. L'article L.2141 11, modifié par la loi 2011-814 du 7 juillet 2011 prévoit que « *Toute personne dont la prise en charge médicale 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* ». Par ailleurs, le plan Cancer 2014-2019 a intégré des mesures concernant la PF, stipulant que « *l'accès aux traitements du cancer et en particulier aux traitements innovants, doit être garanti à tous les malades* ».

2. Techniques permettant de préserver des gamètes féminines

Plusieurs techniques permettant de cryoconserver des cellules germinales des femmes sont disponibles aujourd'hui. La congélation d'ovocytes matures ou d'embryons obtenus à partir de ces ovocytes représente la méthode de référence. Cependant, elle ne peut être réalisée chez les jeunes filles pré-pubères, lorsque le traitement doit être débuté en urgence. Elle peut également être problématique dans le cadre de pathologies hormono-sensibles. Aussi, d'autres techniques, bien qu'encore considérées comme expérimentales, peuvent être proposées dans ces situations.

a. *Hyperstimulation ovarienne contrôlée avec recueil d'ovocytes matures*

Cette technique est actuellement la technique de référence et doit être proposée aussi souvent que possible (Donnez and Dolmans, 2017). L'objectif est de stimuler les ovaires afin d'obtenir des ovocytes matures qui pourront être vitrifiés tels quels ou après fécondation (Figure 14).

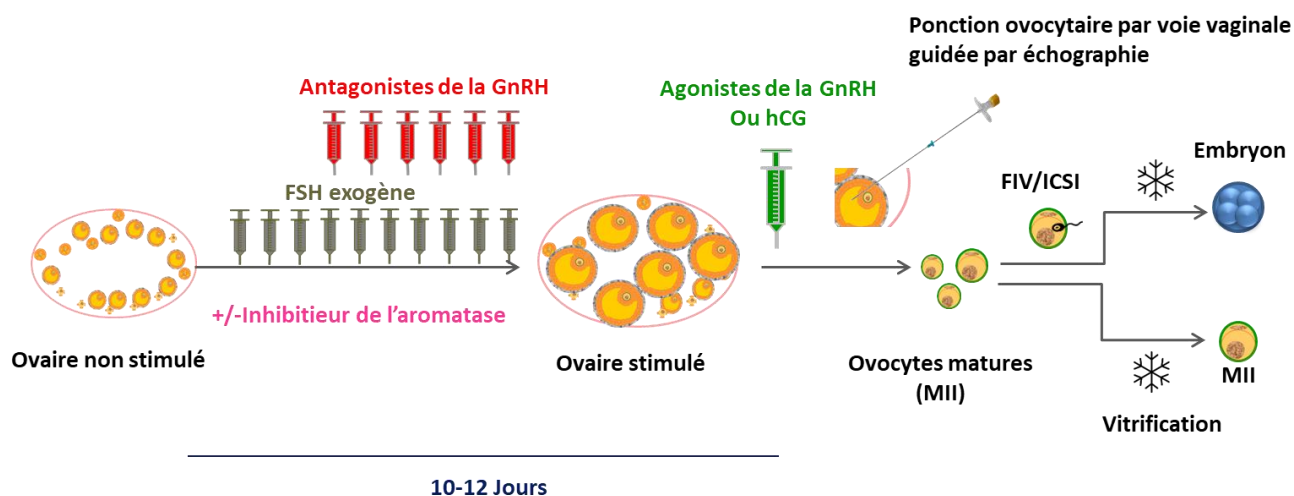


Figure 14. Principes de la stimulation de l'ovulation en préservation de la fertilité. Un apport d'une activité FSH exogène combinée à un blocage de l'ovulation permet le développement coordonné de plusieurs follicules. L'ovulation est alors déclenchée et les follicules ponctionnés. Afin de diminuer les complications iatrogènes, le déclenchement de l'ovulation est souvent réalisé par des agonistes de la GnRH. Les ovocytes matures obtenus ont repris leur méiose et sont au stade métaphase II (MII). Ils peuvent alors être vitrifiés tels quels ou après fécondation. Si la stimulation de l'ovulation peut démarrer à n'importe quel moment du cycle menstruel, sa durée reste d'environ 10 à 12 jours. L'addition de molécules anti-aromatase permet d'éviter une hyperoestradiolémie supra-physiologique, potentiellement délétère dans le cadre de pathologies hormono-sensibles comme le cancer du sein.

Les principes de la stimulation ovarienne dans cette situation sont les mêmes que ceux utilisés avant FIV. Un apport de FSH exogène permet la croissance concomitante de plusieurs follicules. La combinaison avec des antagonistes de la GnRH évite une ovulation prématurée. L'ovulation sera déclenchée lorsque plusieurs follicules auront atteint une taille compatible avec la maturation ovocytaire, soit 16 à 22 mm. Trente-six heures après l'injection d'hCG (action équivalente à la LH), les follicules sont ponctionnés par voie vaginale, guidée par échographie ce qui permet de recueillir des ovocytes matures. Plusieurs modifications des protocoles classiques de stimulation utilisés quotidiennement dans les centres d'AMP ont permis de s'adapter aux diverses contraintes de la pathologie cancéreuse. Il est maintenant clairement établi que la stimulation peut être démarrée à n'importe quel moment du cycle menstruel sans altérer le nombre ni la qualité des ovocytes récupérés (Sönmezer *et al.*, 2011). Deuxièmement, afin de limiter l'augmentation supra-physiologique de l'œstradiol induite par la stimulation, des protocoles spécifiques utilisant des antagonistes de l'aromatase, tels que le letrozole, ont été proposés. Le principal objectif est d'éviter un potentiel impact négatif de l'hyper-œstrogénie sur les cellules tumorales (Checa Vizcaíno *et al.*, 2012). Cette stratégie a démontré sa sécurité sur le plan de la survie du cancer du sein (Azim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2016). Enfin, le déclenchement de l'ovulation est souvent réalisé grâce à un agoniste de GnRH, induisant la libération de gonadotrophines endogènes capables d'induire l'ovulation tout en évitant le syndrome d'hyperstimulation de l'ovulation, principale complication iatrogène des protocoles de stimulation ovarienne (Pereira *et al.*, 2016). Les ovocytes matures obtenus peuvent être congelés par une technique de vitrification qui permet d'excellents taux de survie après décongélation sans affecter la qualité de ces ovocytes (Cobo *et al.*, 2016). Pour les patientes en couple, si elles le souhaitent, il est possible de cryconserver des embryons obtenus après FIV des ovocytes avec les spermatozoïdes de leur conjoint. Cependant, dans cette situation, les patientes doivent être prévenues que, dans l'état actuel de la loi, ces embryons ne pourront être utilisés que par le couple.

Les données concernant les grossesses obtenues après réutilisation des ovocytes vitrifiés avant cancer sont encore rares. Dans cette situation, les taux de grossesses vivantes rapportées varient de 22% à 45% par embryon transféré (Martinez and International Society for Fertility Preservation-ESHRE-ASRM Expert Working Group, 2017). Les chances de grossesses sont fortement corrélées à l'âge au moment de la PF ainsi qu'au nombre d'ovocytes matures obtenus (Goldman *et al.*, 2017b). Dans le cadre de la préservation de la fertilité dite « sociétale » ou « pour âge », il a été estimé qu'avant 35 ans, les chances de naissances vivantes étaient de 60% lorsque que 10 ovocytes matures étaient vitrifiés, ce taux chutant à 30% pour les femmes de plus de 36 ans (Cobo *et al.*, 2016).

b. *Maturation in vitro* après recueil d'ovocytes non matures

La technique de Maturation *in vitro* (MIV) des ovocytes est encore considérée comme expérimentale. Elle débute par le recueil de complexes cumulo-ovocytaires (COCs) au sein des petits follicules antraux. Les ovocytes obtenus sont à un stade encore immature et sont ensuite cultivés *in vitro*, au laboratoire, pendant 24 à 48 heures dans un milieu adapté afin de devenir fécondables. Ils pourront ensuite être vitrifiés en l'état ou fécondés avant d'être congelés (Figure 14). La ponction des COCs peut être réalisée par voie transvaginale échoguidée ou *ex vivo*, sur une pièce de cortex ovarien. Elle présente l'avantage de pouvoir être associée à une cryoconservation de cortex ovarien et réalisée chez des jeunes filles pré pubères. Cette technique ne nécessite pas de stimulation ovarienne préalable, n'induit pas d'hyperoestrogénie et peut être pratiquée en urgence, à tout moment du cycle menstruel.

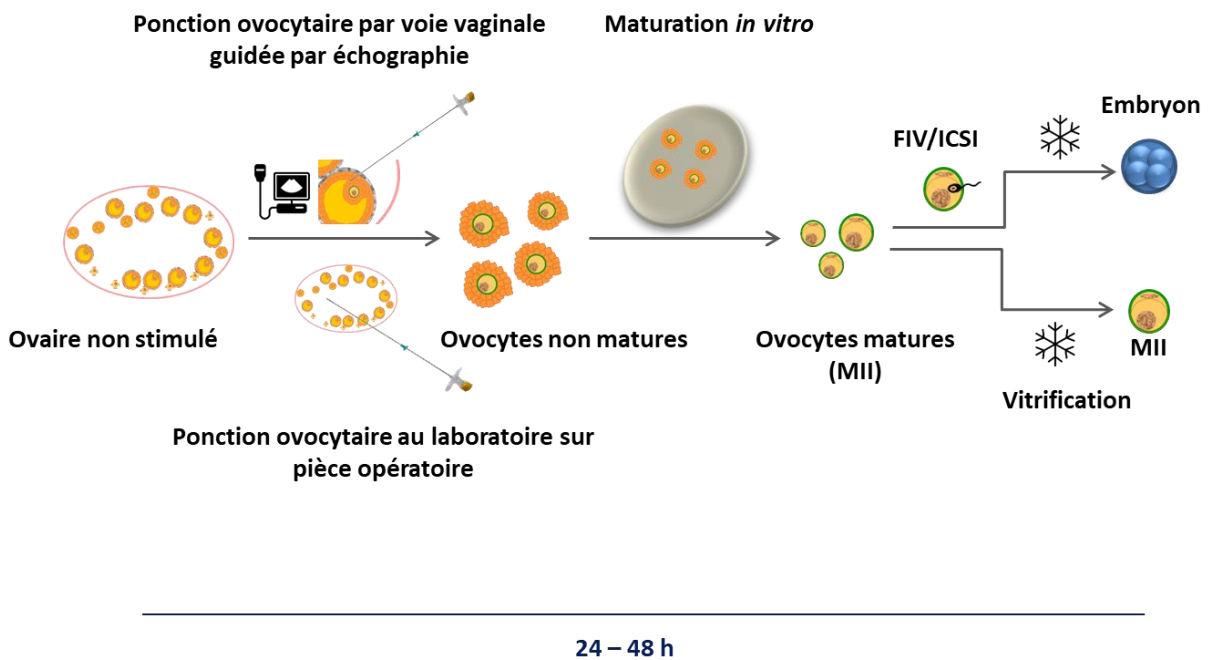


Figure 15. Principes de maturation *in vitro* (MIV). La ponction des ovocytes immatures peut être réalisée par voie transvaginale guidée par échographie ou sur une pièce de cortex ovarien. Les ovocytes récupérés sont ensuite maturés au laboratoire dans un milieu adapté. Les ovocytes matures (MII) obtenus peuvent être vitrifiés tels quels ou préalablement fécondés.

La MIV a été initialement développée pour les patientes présentant un SOPK car elle permet de les soustraire au risque d'hyperstimulation ovarienne mais ses différentes caractéristiques en font une technique particulièrement intéressante dans le cadre de la PF (Grynberg *et al.*, 2013). Cependant, la qualité des ovocytes obtenus n'est pas bien connue et, dans le cadre du SOPK, les taux de grossesses cliniques et de naissances restent inférieurs à ceux

obtenus avec des ovocytes maturés *in vivo* (Gremeau *et al.*, 2012). A ce jour, plus de 5.000 naissances ont été obtenues suite à une MIV dans un contexte de SOPK, avec des données rassurantes quant au devenir des enfants (Yang and Chian, 2017). Cependant, très peu d'études permettent d'estimer les résultats de cette technique dans le cadre de la préservation de la fertilité. A ce jour, une seule grossesse a été publiée lorsque la ponction d'ovocytes a été réalisée par voie transvaginale (Creux *et al.*, 2018), et moins de 5 lorsque les ovocytes ont été ponctionnés *ex vivo*, sur une pièce de cortex ovarien (Prasath *et al.*, 2014; Segers *et al.*, 2015; Uzelac *et al.*, 2015).

c. Cryopréservation de cortex ovarien

L'objectif de la congélation de tissu ovarien est de conserver un grand nombre de follicules primordiaux présents au niveau du cortex ovarien en vue d'une éventuelle greffe si la fonction ovarienne s'avère altérée après la fin des traitements gonadotoxiques. Un ovaire entier ou un lambeau de tissu est prélevé par cœlioscopie, sous anesthésie générale (Beckmann *et al.*, 2016). Le prélèvement peut être réalisé avant ou après la puberté et, le cas échéant, à n'importe quel moment du cycle menstruel. Au laboratoire, le cortex ovarien est isolé de la médulla puis congelé sous forme de fragments d'environ 1 cm², généralement par une technique de congélation lente puis stockés à -196°C (Figure 16).

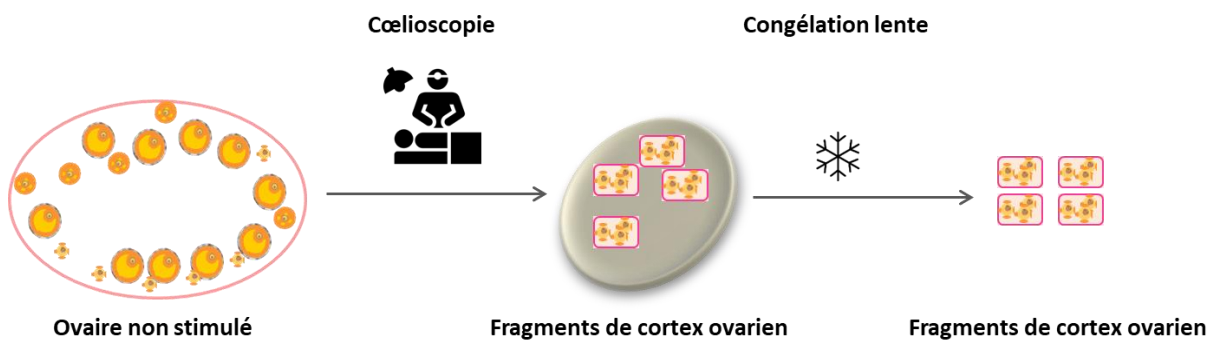


Figure 16. Principe de la cryopréservation de cortex ovarien. Le prélèvement d'un fragment de cortex ovarien ou d'un ovaire entier est réalisé par cœlioscopie. Les lambeaux de cortex obtenus sont ensuite préparés en petit fragments de 1cm² avant d'être congelés. La greffe de ces fragments sera réalisée à distance si nécessaire.

Lors de la réutilisation, les fragments sont décongelés puis greffés en site orthotopique (fossette ovarienne, cavité péritonéale ou sur ovaire restant) ou, plus rarement, en site hétérotopique (avant-bras, paroi abdominale). La première naissance vivante après greffe de tissu ovarien congelé a été rapportée en 2004 (Donnez *et al.*, 2004). Depuis, les dernières séries publiées font état d'une centaine d'enfants nés après greffe, naturellement ou après FIV et d'une efficacité qui avoisinerait les 20 à 30% de grossesse par greffe (Donnez and Dolmans, 2017). Malgré l'augmentation importante des données prometteuses sur la réutilisation, cette technique est encore considérée comme expérimentale, la greffe ne pouvant être pratiquée que dans le cadre d'un projet de recherche clinique.

Cette technique est la seule à offrir la possibilité de restituer une fonction ovarienne exocrine et endocrine aux patientes à haut risque d'IOP et elle présente l'avantage de pouvoir être réalisée dans l'enfance, dès le plus jeune âge. En effet, il a été montré que la greffe de cortex ovarien prélevé dans l'enfance est capable d'induire une puberté (Poirot *et al.*, 2012) et récemment la première grossesse suite à la réutilisation de cortex ovarien prélevé dans l'enfance a été décrite (Demeestere *et al.*, 2015). Après la greffe, l'activité ovarienne est restaurée dans plus de 95% des cas et la durée de vie moyenne du greffon est de 4 à 5 ans, en fonction de la densité de follicules primordiaux. Enfin cette technique présente certains inconvénients comme le risque de réintroduction des cellules malignes ou la perte importante de follicules primordiaux au cours des différentes étapes (prélèvement, congélation, décongélation, greffe). De multiples voies d'amélioration sont en cours de développement, comme la mise au point de techniques de détection ultra-sensibles des cellules cancéreuses résiduelles ou l'utilisation de molécules ayant pour objectif d'inhiber la perte folliculaire (Fisch and Abir, 2018).

3. Techniques permettant de protéger les ovaires

Une autre stratégie intéressante de préservation de la fertilité serait de limiter la perte folliculaire induite par la chimiothérapie. A ce jour, seuls les agonistes de la GnRH ont été testés chez la femme avec des résultats très controversés (Horicks *et al.*, 2018). Ce mécanisme de préservation de la fertilité étant une part majeure du projet de cette thèse, il sera discuté en détail dans la discussion générale de ce manuscrit.

4. Stratégies de préservation de la fertilité féminine.

Le choix de la technique de PF à mettre en place dépend de nombreux facteurs liés à la fois à la patiente, à la pathologie et au traitement programmé.

L'âge au moment du diagnostic est un facteur clef guidant le choix de la méthode à envisager. En effet, certaines techniques ne pouvant être proposées avant la puberté alors que d'autres, comme la cryopréservation de cortex ovarien, ne semblent pas être efficaces après 36 ans. Le statut ovarien et plus exactement l'estimation de la réserve ovarienne est également à considérer. Des associations de techniques peuvent être offertes en cas d'altération de la réserve ovarienne initiale afin d'optimiser les chances en augmentant le nombre de gamètes préservées. Enfin, le désir de grossesse, le statut marital, mais aussi le poids corporel ou les éventuelles pathologies associées sont également à prendre en compte. Le type de pathologie, son hormono-sensibilité, son pronostic et son risque de dissémination sont également des éléments majeurs permettant d'évaluer l'intérêt de réaliser une PF et l'adapter au mieux. Enfin, les traitements envisagés, l'urgence à les débiter et leur gonadotoxicité potentielle sont des éléments majeurs à ne pas négliger (von Wolff *et al.*, 2018). Les différentes techniques de PF disponibles aujourd'hui sont reportées dans la figure 17.

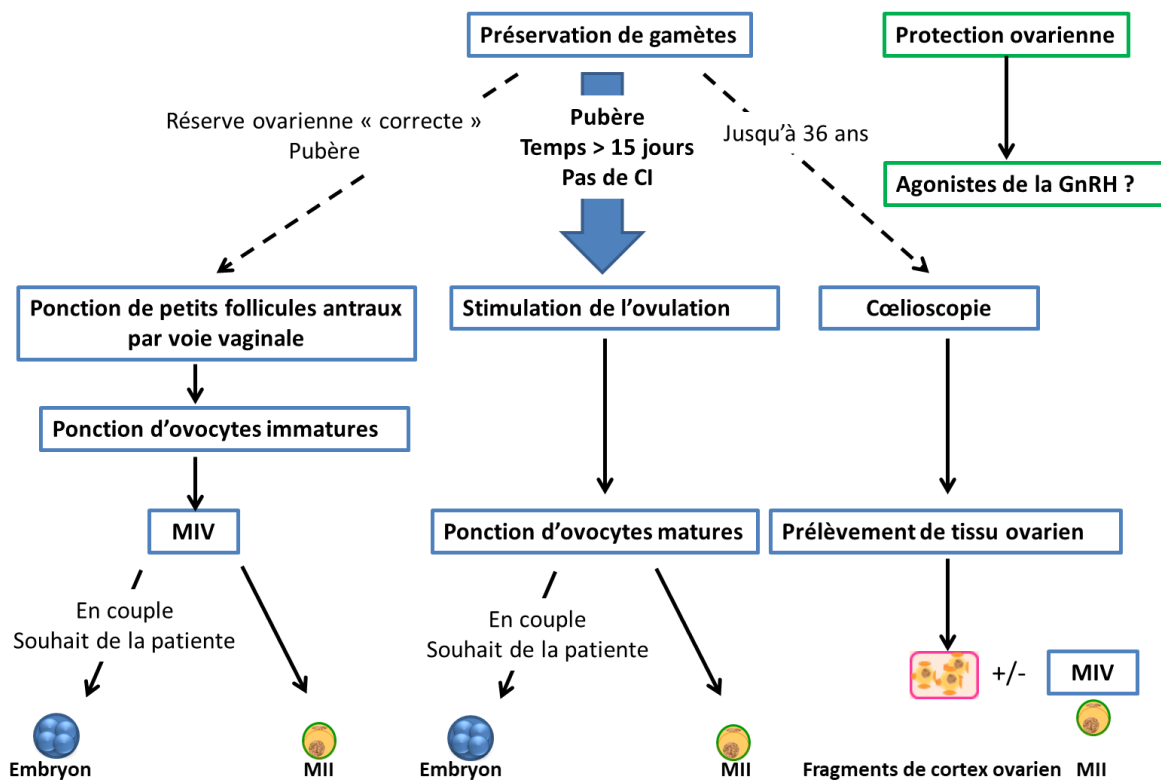


Figure 17. Stratégies de préservation de la fertilité disponibles aujourd'hui. La congélation ovocytaire ou embryonnaire après stimulation est la seule technique qui n'est pas considérée comme expérimentale. Elle est à privilégier chez les femmes pubères, ne présentant pas de contre-indication à la stimulation et lorsque le temps est suffisant avant le début des traitements. Dans un contexte d'urgence thérapeutique, un prélèvement de cortex ovarien peut être proposé chez les enfants et les femmes de moins de 36 ans. La maturation in vitro (MIV) peut être indiquée lorsque la réserve ovarienne est suffisante mais cette technique se doit d'être proposée en association avec une cryopréservation de cortex ovarien.

Etat des connaissances

La décision finale concernant la stratégie de PF à mettre en place est à individualiser en fonction de la patiente et du contexte, elle résulte d'une concertation multidisciplinaire entre les médecins spécialisés en oncofertilité et les oncologues. *In fine*, le choix sera fait par la patiente, après information éclairée sur la faisabilité des techniques et les avantages et inconvénients de chacune. Par ailleurs, afin d'éviter au maximum les faux espoirs, il est essentiel d'expliquer à la patiente qu'aucune de ces stratégies ne représente des garanties de grossesse.

OBJECTIFS

Objectifs

Objectifs

La chimiothérapie induit une baisse de la fertilité en exerçant une toxicité directe sur les ovaires. Elle entraîne une déplétion du stock ovocytaire par des mécanismes encore mal connus et controversés. Pour mieux comprendre l'impact ovarien de ces drogues plusieurs hypothèses ont été proposées: les cibles cellulaires des agents cytotoxiques pourraient être les cellules germinales et/ou les cellules somatiques. Les agents utilisés pourraient agir directement sur les follicules primordiaux constituant le stock de réserve et/ou sur les petits follicules en croissance sécrétant l'AMH. Les modèles animaux ont permis d'évaluer partiellement les effets des différents agents cytotoxiques sur les fonctions ovariennes. Le cyclophosphamide, agent alkylant utilisé entre autres dans le traitement du cancer du sein, est une des chimiothérapies reconnues comme la plus gonadotoxique. Il a été montré, sur la souris, que la destruction folliculaire augmentait de manière exponentielle en fonction des doses. Récemment, un nouveau mécanisme de déplétion folliculaire induit par le cyclophosphamide, appelé «effet burn-out» a été proposé et consiste en une entrée massive en croissance des follicules au repos qui sont ensuite détruits. L'AMH étant un des facteurs régulant la sortie des follicules primordiaux de la réserve ovarienne, la première partie de ce projet de thèse vise à évaluer les effets de l'administration d'AMH recombinante chez des souris auparavant traitées par le cyclophosphamide. L'hypothèse principale est que ce traitement serait en mesure de limiter la perte folliculaire en renforçant l'effet inhibiteur exercé par l'AMH sur l'entrée en croissance des follicules primordiaux. Les objectifs secondaires de ce projet sont de (i) valider que le cyclophosphamide induit une déplétion folliculaire par un mécanisme de « burn out » et (ii) d'explorer les mécanismes moléculaires mis en jeu par l'AMH pour inhiber l'entrée en croissance des follicules. Les résultats obtenus sont introduits, présentés puis discutés dans la première partie des résultats.

Lors de ce premier travail, j'ai évalué la réserve ovarienne chez les souris en fonction du traitement reçu. La méthode de référence consiste en un comptage exhaustif du nombre de follicules primordiaux contenus dans les ovaires de ces souris par l'analyse histologique de l'ovaire entier. Ce procédé, particulièrement long et fastidieux m'a amenée à contacter une entreprise spécialisée dans l'intelligence artificielle. Ensemble, nous avons développé une technique de comptage folliculaire automatisé. Les différentes étapes de la mise au point de cette méthode et les résultats obtenus sont présentés dans la seconde partie des résultats. Les possibles applications de cette technologie innovante sont ensuite discutées.

Objectifs

RESULTATS

I. Première partie: L'AMH protège la réserve ovarienne chez les souris traitées par le cyclophosphamide

A. Introduction

Les agents alkylants sont couramment utilisés dans le traitement des cancers gynécologiques et des hémopathies, pathologies malignes les plus fréquentes de la femme jeune. Cette classe pharmacologique comprend un très grand nombre de substances parmi lesquelles les moutardes azotées, dont le Cyclophosphamide (Cy) est le principal représentant. Elles interagissent avec l'ADN pour empêcher sa réplication et sa transcription afin d'induire, *in fine*, une apoptose cellulaire. Cependant, ces agents ne ciblent pas uniquement les cellules tumorales et affectent, de la même façon, les cellules normales et plus particulièrement les tissus présentant un taux de renouvellement important, dont les gonades.

L'impact de la chimiothérapie sur les ovaires dépend fortement du type de molécule utilisée. Le Cy est reconnu comme l'un des agents les plus gonadotoxiques car il induit, non seulement une atresie des follicules en croissance, mais aussi une altération de la réserve ovarienne et au maximum une IOP tant chez la femme que chez la souris (Meirow *et al.*, 1999; Tham *et al.*, 2007b). Récemment la théorie du « burn-out » folliculaire, expliquant la déplétion folliculaire par une entrée en croissance massive des follicules de réserve a été proposée chez la souris (Kalich-Philosoph *et al.*, 2013).

Comme nous l'avons développé dans la partie « état des connaissances » de ce manuscrit, le recrutement initial des follicules primordiaux est régulé par de nombreux facteurs dont l'AMH. Dans ce travail, nous avons émis l'hypothèse qu'un traitement par AMH recombinante pourrait limiter la perte folliculaire liée au Cy en inhibant l'activation de ces follicules de réserve. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé un modèle de souris pubères, traitées par Cy en association, ou non, avec de l'AMH recombinante. Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact de ces différents traitements sur le stock des follicules primordiaux, puis nous avons étudié la fonction ovarienne et la reproduction de ces souris au cours et au décours des traitements reçus. Enfin, nous nous sommes interrogés sur les mécanismes moléculaires permettant à l'AMH de préserver le pool des follicules primordiaux. De manière intéressante, les différents résultats obtenus ainsi que des travaux réalisés en parallèle au laboratoire, nous ont amenés à faire l'hypothèse que l'autophagie pouvait être impliquée. Avant de présenter l'Article 1 qui comprend les principaux résultats obtenus, les grands principes de l'autophagie sont précisés ci-dessous.

Résultats

La macro-autophagie qu'on appellera par la suite autophagie est un processus physiologique qui permet la dégradation aléatoire de portions de cytoplasme de la cellule par les lysosomes. Ce phénomène est reconnu depuis plusieurs années comme étant essentiel à l'homéostasie cellulaire conduisant Yoshinori Ohsumi à obtenir le prix Nobel de médecine en 2016 pour ses travaux sur l'autophagie. Dans des conditions physiologiques, la dégradation autophagique se produit à un niveau basal, assurant l'élimination de matériels potentiellement dangereux qui peuvent s'accumuler, comme par exemple des mitochondries altérées, des agrégats protéiques.... L'autophagie fonctionne de façon continue comme un système de contrôle de qualité pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. C'est un processus dynamique durant lequel une partie du contenu du cytoplasme est séquestré dans une double membrane, appelée phagophore, qui va s'allonger puis se fermer pour constituer une vacuole, l'autophagosome. Ce dernier va fusionner avec un lysosome pour former un autolysosome dans lequel les hydrolases acides vont permettre la digestion du contenu. La formation de l'autophagosome nécessite l'intervention de plusieurs protéines ATG (Autophagy related gene), qui sont fortement conservées de la levure aux cellules de mammifères. Ces protéines interagissent entre elles sous forme de complexes permettant la biogenèse de l'autophagosome (Mizushima *et al.*, 2011). LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) (ATG8 chez la levure) est une protéine ATG qui, après clivage et conjugaison au phosphotidyl-éthanolamine (PE) aboutit à la formation de LC3-II nécessaire à l'élongation du phagophore et la formation de l'autophagosome. Cette protéine est la seule qui reste associée à la membrane de l'autophagosome ce qui en fait un marqueur de choix pour révéler la présence d'autophagosome (Wesselborg and Stork, 2015). P62 est une protéine dégradée spécifiquement par autophagie, qui est aussi utilisée pour suivre ce processus (Figure 18).

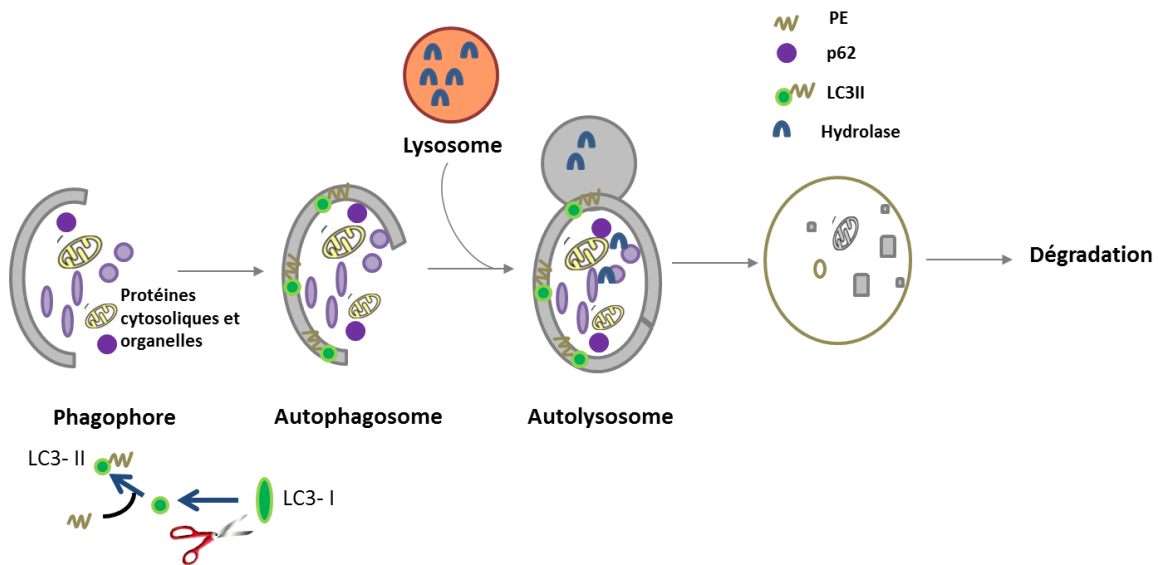


Figure 18. Principales étapes de l'autophagie. Lorsque l'autophagie est activée, des protéines cytoplasmiques et organelles sont englobées dans le phagophore. Celui-ci va ensuite s'allonger puis se fermer pour former un autophagosome. Ce dernier va ensuite fusionner avec un lysosome pour former un autolysosome dans lequel les hydrolases acides vont permettre la digestion du contenu. P62 est spécifiquement dégradée par autophagie. LC3II, formée après clivage de LC3I et couplage avec le PE fait partie intégrante de la membrane de l'autophagosome.

L'autophagie est un mécanisme très précisément contrôlé. Dans des conditions physiologiques, elle est maintenue dans un état basal et peut être activée dans certaines situations, comme la carence nutritionnelle, ce qui permet la protection de la cellule contre cet état de stress (Mizushima *et al.*, 2011). La régulation de l'autophagie est complexe et fait intervenir de nombreuses voies de signalisation. Le principal régulateur en amont de la machinerie moléculaire de l'autophagie est la kinase mTOR qui exerce un contrôle négatif sur l'autophagie. Dans la cellule, mTOR est présente sous forme de deux complexes : mTORC1 et mTORC2 qui activent différents substrats tels qu'AKT ou S6 kinase (S6K). mTORC1 est régulé par le complexe TCS1/TSC2, lui-même contrôlé par la voie de signalisation PI3K (Figure 19).

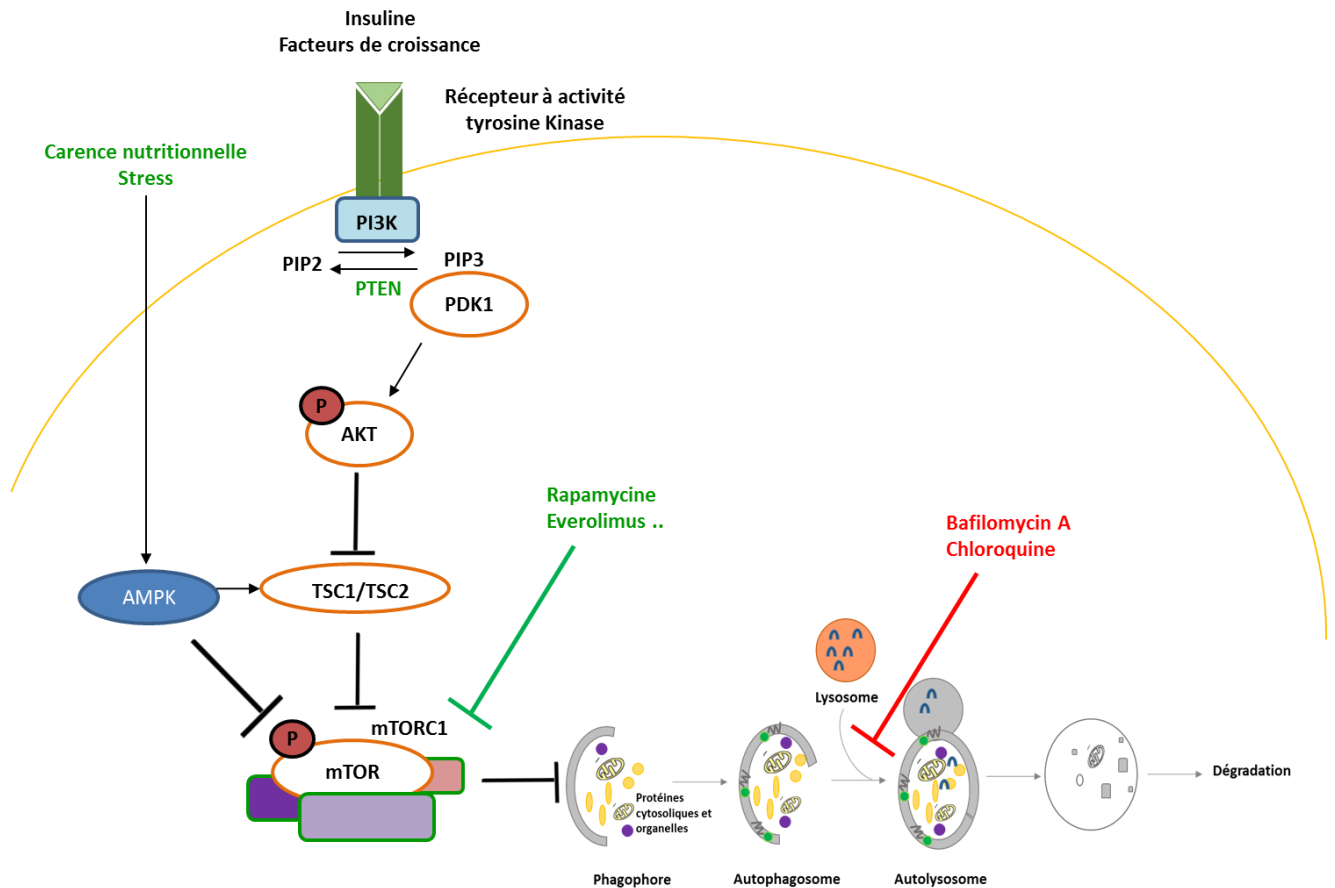


Figure 19. Principaux mécanismes de régulation de l'autophagie. L'autophagie est régulée par des stimuli intra et extra-cellulaires qui mettent en jeu différentes voies de signalisation. mTOR, agissant au sein du complexe mTORC1 exerce un effet inhibiteur sur l'autophagie. Ce complexe est régulé par l'hétérodimère TCS1/TSC2 lui-même régulé en amont par différentes voies de signalisations dont la voie PI3K ou AMP Kinase. L'activation de la voie PI3K empêche l'autophagie en inhibant le complexe TSC1/TSC2. Au contraire une situation de carence nutritionnelle active le complexe TSC1/TSC2 ce qui inhibe l'activité de mTORC1 et induit l'autophagie. Les facteurs induisant l'autophagie sont en vert et les facteurs bloquant l'autophagie sont en rouge.

Les rôles de l'autophagie sont nombreux et complexes. L'autophagie a d'abord été décrite comme un processus essentiel à la survie, au maintien de l'homéostasie cellulaire qui nécessite l'élimination et le remplacement continu des protéines et des organites non fonctionnels. D'autre part, l'autophagie représente un mécanisme de survie dans certaines conditions. Cependant, depuis plusieurs années, un processus de mort cellulaire autophagique a également été mis en évidence, notamment en situation de stress. Ainsi, l'autophagie peut paradoxalement, soit conduire à la protection et donc à la survie de la cellule, soit mener à sa mort.

B. Article 1

**AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in
cyclophosphamide-treated mice**

Charlotte Sonigo¹, Isabelle Beau¹, Michael Grynberg², and Nadine Binart¹

Soumis FASEB J

AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in cyclophosphamide-treated mice

Charlotte Sonigo¹, Isabelle Beau¹, Michael Grynberg², and Nadine Binart¹

¹ Inserm U1185, Faculté de médecine Paris-Sud, Université Paris Saclay, Le Kremlin Bicêtre, 94276, France

² Department of Reproductive Medicine and Fertility Preservation, Hôpital Antoine Bécère, 92140 Clamart, Université Paris Saclay, Le Kremlin Bicêtre, 94276, France

Correspondence: Dr Nadine Binart, Inserm U1185, Université Paris Sud, 63 Rue Gabriel Péri, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France.

E-mail: nadine.binart@inserm.fr

Running title: AMH prevents fertility loss due to cyclophosphamide

Nonstandard abbreviations

AMH: Anti-Müllerian Hormone

Cy: Cyclophosphamide

EGF: early growing follicles

FP: Fertility Preservation

PI3K: phosphatidyl-inositol-3-kinase

PMF: Primordial follicles

POI: Primary Ovarian Insufficiency

Abstract

The follicular ovarian reserve, constituted by primordial follicles (PMF) is established early in life then keeps declining regularly along reproductive life. The maintenance of a normal female reproductive function, implies the presence of a vast majority of dormant PMF. This process involves a continuous repression of PMF activation into early growing follicle through the balance between factors activating the initiation of follicular growth, mainly actors of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signaling pathway, and inhibiting factors such as Anti-Müllerian Hormone (AMH). Any disruption of this balance may induce follicle depletion and subsequent infertility. It has been recently proposed that cyclophosphamide (Cy), an alkylating agent commonly used for treating breast cancer, triggers PMF activation further leading to premature ovarian insufficiency. Preventing chemotherapy-induced ovarian dysfunction might represent an interesting option for preserving optimal chances of natural or medically assisted conceptions after healing. The aim of the present study is to evaluate, in a model of Cy-treated pubertal mice, whether AMH administration might restrain PMF depletion. The counting of the total PMF number within mouse ovaries showed that recombinant AMH prevented Cy-induced PMF loss. Western blotting revealed activation of PI3K signaling pathway following Cy administration. After AMH injection, FOXO3A phosphorylation, a main actor of PMF activation was significantly decreased. Taken together, these results support a protective role of AMH against Cy-induced follicular loss. We also provide evidence for a possible role of autophagy in the preservation of follicular pool reserve. Therefore, concomitant recombinant AMH administration during chemotherapy might offer a new option for preserving young patients' fertility.

Keywords: Anti-Müllerian Hormone · Alkylating agents · Burn out · oncofertility · autophagy

Introduction

In humans as in rodents, the pool of resting primordial follicles (PMF) is established early in life and serves as the source of growing follicles and fertilizable eggs for the entire female reproductive life. Actually, each PMF can remain quiescent throughout years; be activated and enter the growing process; or undergo atresia directly from the dormant stage (1). The activation or initial recruitment of PMF starts during fetal (in humans) or neonatal (in rodents) period, continues along reproductive life and is finely controlled. A balance between inhibitory and stimulatory factors may be crucial for maintaining the female reproductive lifespan.

Genetically modified mouse models and *in vitro* experiments have allowed deciphering diverse local factors involved in initial follicle recruitment. Thus, several studies highlighted the functional roles of the phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) signaling pathway in oocytes in controlling follicular activation (2). The use of specific activators or inhibitors confirmed the crucial role of the PI3K-PTEN-AKT-FOXO3 pathway in PMF activation (3).

Anti-Müllerian Hormone (AMH) is expressed by granulosa cells and produced by growing follicles ranging from the primary stage of development until selection for dominance. This peptide might also be involved in PMF initial recruitment (4). The ovaries of *Amh*^{-/-} mice show both a reduced number of PMF and an increased number of growing follicles compared with wild type ovaries (5). These results suggest that AMH might act as a key factor in the regulation of primordial recruitment. Moreover, *in vitro* experiments on human (6), bovine (7), rat (8) or mouse ovaries (9) showed that the transition from primordial into growing follicle was enhanced in the absence of AMH whereas this activation was blocked when AMH was added into the culture medium. Another model, using graft of mouse ovarian cortex in chicken embryo, which contains high levels of AMH, confirmed this hypothesis (10). Indeed, PMF recruitment was reduced when mouse ovarian cortex was implanted into chicken embryo. However, PMF were recruited in high rate after implantation of *Amhr2*^{-/-} mouse ovarian cortex or when the graft was performed in gonadectomized chicken (ie. without endogenous AMH) (10). Thus, a synergistic and coordinated suppression of follicular activation provided by multiple inhibitory molecules may be necessary to preserve the dormant follicular pool. Any disorder in the regulation process may lead to a premature loss of the follicular stockpile and at worst to primary ovarian insufficiency (POI) (11).

POI is a well-known long-term side-effect of cancer chemotherapy treatment. The extent of ovarian damages depends on several factors of which the most important are the type of drug and its dosage (12). Cyclophosphamide (Cy) is an alkylating agent, widely used for gynecological cancers, and recognized as one of the most deleterious for the follicular stockpile. Mechanisms by which chemotherapy damages ovarian reserve are not yet fully understood and remain debated (13). Several hypotheses have been proposed. On the one hand, chemotherapeutic agents could exert a direct toxicity to follicles by apoptosis due to DNA damages. On the other, it has been suggested that drugs could trigger an indirect depletion of PMF by over recruitment via PI3K pathway activation and further growing follicle apoptosis (14, 15).

However, the use of chemotherapeutic agents has largely contributed to the dramatic improvement in the rate of cure of young women suffering from cancer. For these survivors, fertility represents an important concern, and safeguarding the possibility of becoming genetic mother constitutes a key point for their quality of life (16). Therefore, fertility preservation (FP) has become a major issue in the care-personalized path of young cancer patients (17). Currently, most of methods for female FP are based on gamete storage which is still suboptimal in terms of success. Preventing chemotherapy-induced ovarian dysfunction might represent an interesting option for preserving optimal chances of natural or medically assisted conceptions after healing (18).

Based on AMH physiologic role, we hypothesized that administration of this peptide concomitantly to Cy might directly inhibit PMF recruitment, leading to an overall reduction in PMF loss and further better fertility post-chemotherapy. Using a pubertal mouse model, this study aims to evaluate the effects of these treatments on the PMF stockpile and subsequent fertility.

Materials and methods

Animals

Six-week-old female mice (n=120) (Janvier, France) were provided ad libitum access to food and water (deionized) and were housed under conditions of constant temperature ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity (min. 50%), and lighting (12L: 12D, lights-on at 0700 h). Mice were acclimated during 14 days before experimentation.

Animals were given a single intraperitoneal injection of 100 μl of vehicle (PBS) (n=34), or an equal volume containing either 150 mg/kg of Cy (Cyclophosphamide monohydrate,

Sigma-Aldrich, C7397) (n=34), or (5mg/kg) of recombinant AMH (mus musculus recombinant Müllerian Inhibiting factor, Cusabio) (n=14) or both Cy and AMH (n=14). A first series of animals was sacrificed 24 hours after treatment and ovaries were removed for histological or western blot analysis. The second series of mice was sacrificed 8 days after treatment and ovaries were removed for histological analysis.

For fertility trial, 24 animals received an intraperitoneal injection/week during 4 weeks, of PBS, Cy 75 mg/kg, AMH 0.5mg/kg, or both Cy + AMH (n=6/group).

The animal facility was granted approval (N°C94-043-12), given by the French Administration (Ministère de l'Agriculture). All procedures were approved by the local ethic committee Consortium des Animaleries Paris Sud (CAPSud) (N°2012–021).

Analysis of estrous cyclicity

Estrous cyclicity was determined by cytological evaluation of vaginal smears as previously described (19).

Ovulation protocol

At the end of the fertility assessment, treated and control females were ovulated by intraperitoneal injection of 10 IU recombinant Follicle Stimulating Hormone (Gonal F; Merck Serono, France), followed by intraperitoneal injection of 5 IU human Chorionic Gonadotropin (hCG; Schering-Plough, Courbevoie, France) 48 h later. Animals were sacrificed 17 h after the hCG injection. Oocytes were extracted from the ampulla and counted after enzymatic dissociation from the surrounding cumulus with a solution of 10 mg/mL hyaluronidase (Sigma).

Follicle count

Ovaries were fixed in Bouin's solution then embedded in paraffin in an automated tissue processor. Whole ovaries were serially cut into 4 µm sections. One out of five sections was mounted on glass slides and stained with Hematoxylin Eosin (HE). The Panoramic 250 Flash, Slide Scanner (3DHISTECH Ltd. HUNGARY) system was used to capture digital whole slide high-resolution images (0.122µm/pixel) with a 40× Plan-Apochromat objective and a 1.6x camera adapter magnification. Each slide containing 8 ovary sections was analyzed using Calopix Viewer[®] by the same observer, blinded to the treatment received by mice. Follicle stage was classified according to accepted definitions (20) and counted: i) primordial follicle: a nucleus surrounded by a single layer of flattened squamous follicular cells; ii) primary follicle:

an oocyte surrounded by a single layer of cuboidal granulosa cells; iii) secondary follicle: two or more layers of cuboidal granulosa cells, without antrum; iv) Antral follicles: follicle with an antral cavity, whatever the size. A follicle was counted only if the nucleolus was identified in order to avoid counting the same follicle several times. PMF were considered as resting follicles, whereas both primary and secondary follicles were classified as early growing follicles (EGF).

Immunohistochemistry and immunofluorescence

Ovaries were dissected and fixed in 4% PFA, washed, paraffin-embedded, and sectioned. The ovaries were cut into 4µm thickness and were mounted on slides. Sections were deparaffinized and rehydrated. After epitope retrieval treatment (at 98°C for 30 min in 0.01 M citrate buffer solution, pH 6.0, DAKO, Denmark), nonspecific binding sites were blocked for one hour in blocking solution (DAKO, Protein Block Serum Free) at room temperature. Then sections were incubated with appropriate primary antibodies diluted in DAKO Antibody diluent overnight at 4°C. The sections were washed in PBS and then incubated for one hour with appropriate secondary antibodies diluted in the same buffer. After washing, the sections were finally incubated with DAPI for 5 minutes for fluorescent detection of nuclei morphology. All the sections were rinsed in PBS for 5 min, air dried and cover-slipped using Glycergel (DAKO, Denmark). The tissue sections were then examined by microscopy.

Western blot analysis

Ovaries (n=48) were homogenized in a lysis buffer (65 mM Tris, pH 6.8, 4% SDS, 1.5% β-mercapto-ethanol, protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich) . using a TissueLyser LT homogenizer (Qiagen, Les Ulis, France). After centrifugation (14,000 × g, for 30 min), proteins containing in the supernatant were held at 100°C for 10 minutes. After SDS-PAGE, the proteins were electrotransferred onto a polyvinylidene difluoride or a nitrocellulose membrane. For immunoblotting, the membranes were probed overnight with relevant antibodies and then incubated with appropriated fluorescent or horseradish peroxidase-linked secondary antibodies. Bound immunoglobulins were revealed by fluorescence or chemiluminescent detection (Immobilon Western, Millipore). Membranes were scanned with Odyssey imaging system (LI-COR, Bad Homburg, Germany) and quantification was conducted using Image Studio 1.1 software (LI-COR). All Western blots shown are representative of two to five experiments.

Antibodies

Antibodies directed against actin (clone C4, Millipore), phospho-Akt (4060, Cell signaling), phospho-FOXO3A (9464, Cell Signaling), FOXO3A (Cell Signaling), phospho-P70S6K (9234, Cell Signaling), P70S6K (9202 Cell Signaling), Akt (sc-81434, Santa Cruz), p62 (Abnova) or LC3B (Sigma) were used for western blot and immunohistochemistry. Horseradish peroxidase-linked secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) or immunofluorescent antibodies donkey anti-mouse or donkey anti-rabbit TRITC conjugated (Jackson Immunology) were used for protein gel blot analysis. AlexaFluor 555 labeled anti-rabbit antibody (ThermoFisher Scientific) were used as secondary antibodies for indirect immunofluorescence.

Statistical analysis

All results are expressed as the mean \pm SEM. Statistical differences between groups were tested using one-way ANOVA and Kruskal-Wallis tests. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

RESULTS

Impact of cyclophosphamide on mouse ovaries

To evaluate the effects of Cy on the ovary, six-week-old mice received a single intra-peritoneal injection of Cy or vehicle. One week after the injection, ovaries were removed, serially cut and analyzed after hematoxylin and eosin coloration. All follicles were counted according to Pedersen classification (20). PMF were considered as dormant whereas primary and secondary follicles were considered as early growing follicles (EGF). Examples of ovarian sections of Cy and control mice are shown (Fig. 1A). Ovaries of control mice mostly contained dormant follicles (indicated by black arrow) whereas many EGF (white arrows) were present in Cy group.

Then, the exhaustive PMF and EGF classes were quantified in control and Cy-treated groups. The number of PMF was significantly decreased in Cy-treated mice as compared to control mice (1197 ± 138.2 vs 488.2 ± 55.0 follicles, $p < 0.01$) (Fig. 1B, left panel). Conversely, the number of EGF was slightly increased (648.0 ± 74.06 vs 691.6 ± 81.4 , $p = 0.7$) (Fig. 1B, right panel). These results were emphasized when the ratio of PMF or EGF on the total number of

follicles was considered (Fig.1B). Thus, the pool of PMF declined whereas the pool of EGF augmented one week after Cy injection.

To decipher the signaling pathway of increased follicle recruitment, we evaluated the Cy treatment effect on the PI3K/PTEN/Akt pathway 24 hours after injection. The key proteins of the PI3K pathway were analyzed by western blot. An increased phosphorylation of Akt, P70S6K, and FOXO3A was observed indicating that the PI3K pathway was activated by Cy treatment in ovaries (Fig.1C).

AMH treatment reduces primordial follicle depletion induced by cyclophosphamide

The impact of intra-peritoneal injection of recombinant AMH on ovaries and the effect of co-administration of Cy and AMH on the PMF pool were studied on pubertal female mice. Six-week-old mice were treated with a single intra-peritoneal injection of Cy with or without AMH and were compared to pubertal mice receiving AMH alone or vehicle. Ovaries were removed one week after treatment and prepared for histological analysis. Whereas the activation of PMF recruitment by Cy was confirmed, the treatment of concomitant Cy+AMH administration showed ovaries not different to those of controls (Fig.2A).

The quantification of the different follicle classes further confirmed the deleterious effect of Cy on ovaries. The number of PMF was dramatically reduced (Fig.2B *left panel*) and the number of EGF was increased after a single injection of Cy (Fig.2C *left panel*). In addition, AMH co-treatment suppressed Cy-induced EGF formation (Fig.2C) as the total number of PMF in Cy+AMH group was closed to that of controls (875.5 ± 83.9 vs 813.4 ± 68.7 follicles) (Fig.2B *left panel*). As a result, the relative proportion of dormant follicle was significantly increased in ovaries of mice treated with Cy+AMH as compared to Cy alone (Fig.2B *right panel*). This is in accordance with the significant decreased relative proportion of EGF (Fig.2C *right panel*). Remarkably, as compared to controls, ovaries of mice treated with AMH alone contained more PMF (1080.0 ± 40.8 $p < 0.05$) whereas the ratio of EGF/total number of follicles was significantly decreased (Fig. 2B-C).

To test the effect of AMH on the PI3K signaling pathway, ovaries were removed 24 hours after treatment. Proteins of whole ovaries from each group of mice were extracted and processed for western blot analysis (Fig. 3A). We confirmed the increased phosphorylation of AKT, P70S6K and FOXO3A after Cy alone which was not modified by AMH co-treatment. Interestingly, the phosphorylation of FOXO3A was significantly decreased in ovaries of AMH-treated mice. FOXO3A is a transcription factor which is phosphorylated and exported from the

nucleus to the cytoplasm during follicle activation. The cytoplasmic distribution is an indicator of PMF recruitment. Thus, to further understand the detailed mechanism underlying the modifications in PMF activation following Cy or AMH treatment, we studied the FOXO3A localization within PMF by immunofluorescence analysis. A representative cytoplasmic or nuclear localization of FOXO3A following treatment with Cy or AMH respectively is shown in the Fig. 3B. These results suggest that AMH could prevent PMF activation via suppression of FOXO3A phosphorylation and nuclear export.

AMH co-administration does not restore estrous cyclicity but rescues fertility in Cy-treated mice

To assess the long-term impact of Cy and AMH co-administration on ovarian function and fertility, pubertal mice were treated for 4 weeks by an intra-peritoneal injection of vehicle or Cy weekly either alone or in combination with AMH. Estrous cycles were monitored for a total of 8-week period. Then, 4 weeks after the last injection, these mice were mated with proven fertile male along 15 weeks. At least, 4 weeks after male removal, female mice were superovulated and the response to ovarian stimulation was evaluated (Fig. 4A).

First, estrous cycles were monitored by daily vaginal smear since the beginning of treatment until 4 weeks after the last injection (Fig. 4B). Rapidly, estrous cycles of Cy-treated animals became irregular and the total number of cycles was significantly decreased as compared to controls (6.5 ± 0.4 vs 9.2 ± 0.3 cycles, $p=0.006$). Mice having received co-administration of Cy and AMH exhibited the same profile of cyclicity alterations. Over the same period, mice treated with AMH alone presented also a significant decreased number of estrous cycles over (7.6 ± 0.5 , $p=0.04$) (Fig. 4B). At the end of this evaluation, these mice were mated with proven fertile male in order to assess their fertility and the total number of pups by female was counted (Fig. 5A). The number of cumulative pups per female were slightly decreased in Cy group (47.3 ± 5.9 pups) as compared to controls (53.5 ± 8.2 pups, *ns*) or Cy+AMH mice (53.3 ± 10.5 , *ns*) but did not reach significant differences. Finally, we induced ovulation by administration of gonadotropins (PMSG) 4 weeks after the delivery of the last litter and the total number of eggs reflecting the ovarian reserve was recovered. Only mice treated with Cy alone had a significant decreased number of eggs recovered as compared to other group suggesting an exhaustion of recruitable follicles (Fig. 5B).

AMH preserves ovarian reserve through autophagy

To better understand AMH action in the ovary, we investigated the molecular mechanism that could explain the protective effect of this hormone on PMF pool. Macroautophagy, thereafter referred as autophagy is a lysosomal degradative process implicated in cellular homeostasis, it is mainly under the control of PI3K pathway. Recently, several studies reported that autophagy was involved in both ovarian follicular death and survival, suggesting that this process could be part of maintaining the follicular pool (21, 22). Herein, we hypothesized that autophagy could contribute to AMH action for preserving PMF pool. LC3 and p62, two proteins implicated in the autophagic process, were used to monitor autophagy by western blot (23). The protein LC3 is a marker of the autophagic pathway, presenting two molecular forms, LC3-I and LC3-II. This last form is lipidated and associated with the autophagosomal membrane. Its level correlates with autophagosome numbers. P62 is an autophagic substrate located within autophagosomes. We observed a decrease of LC3-II and an accumulation of p62 in ovaries treated with Cy alone (Fig. 6). We showed that p62 is highly decreased in AMH treated ovaries in association with an increased LC3-II. In the Cy+AMH group the data were similar to controls. Taken together these results suggest that Cy inhibits autophagy while AMH induces autophagy.

DISCUSSION

Cy is currently used for the treatment of gynecological cancers but its particularly high gonadal toxicity represents a major issue. Indeed, Cy induces a depletion of follicular reserve in a dose and age related manner in both women and mice (12, 24). In the present study, we confirmed this negative impact of Cy on the PMF stockpile and showed an increase of the EGF/total number of follicles ratio in Cy-treated mouse ovaries. These findings suggest an accelerated activation of PMF recruitment induced by Cy through an up-regulation of the PI3K/PTEN/AKT pathway in ovaries. Moreover, it causes growing follicle apoptosis, thereby reducing the secretion of inhibitory factors that may prevent PMF activation (25). This recent theory of gonadotoxicity, also known as the “burn out” effect, contrasts with the classical theory of a direct action of chemotherapy on the oocyte DNA contained within the PMF, leading to apoptosis of these dormant follicles. Our results are in accordance with the burn out effect, since we showed, using a western blot analysis of whole ovaries, an increase in the phosphorylation of key proteins of the PI3K pathway in mice treated with Cy. Others also confirmed this mechanism, with Cy or other chemotherapeutic agents (26, 27).

As AMH was suggested to inhibit PMF activation in *in vivo* or *in vitro* mouse models (5, 9, 28), we hypothesized that this hormone could be an effective treatment to limit Cy-induced gonadotoxicity. This hypothesis was supported by the expression of specific AMH receptor, *AmhrII*, in follicles since primordial stage (9, 29). In the present study, we opted for the use of a pubertal mouse model to test this hypothesis, as the ovarian morphology and follicular development in mouse shares a high similarity with that of woman. First, our results showed that, one week after a single administration of high dose of AMH to pubertal mice, the proportion of PMF increased contrasting with the decrease in the proportion of EGF, therefore confirming the inhibitory role of AMH on PMF recruitment. To evaluate whether this action could limit PMF activation due to Cy, mice received an intra-peritoneal injection of recombinant AMH concomitantly to Cy. As expected, ovaries exposed to both treatments showed similar PMF and EGF counting when compared with control group, suggesting that AMH effectively protects the follicular stockpile from Cy-induced damages.

In order to evaluate ovarian long term effect of these treatments (4 weeks) on ovarian function, we choose a non-sterilizing dose of Cy (75mg/kg) (24). Estrous cyclicity was evaluated during this treatment and 4 weeks after the last injection. This protocol was used to mimic the clinical ovarian changes observed in patients having received repeated doses of chemotherapy. Indeed, in women, the process of PMF recruitment to ovulation lasts for about 9 months while it takes only 3 weeks for mice to go through the same steps. Therefore, this model can be used to observe the effect of treatment on the follicle growth and ovarian function. Animals treated with Cy alone exhibited an alteration of estrous cyclicity reflecting the detrimental effect of Cy on growing follicles leading to a disruption of late folliculogenesis. Moreover, estrous cyclicity of mice receiving AMH alone was also altered. This result is in accordance with the inhibiting role of AMH on the growing follicles responsiveness to FSH (4, 30) and with a recent study suggesting that AMH treatment may provide a new method of female contraception (29).

Then, to investigate the long-term effect of Cy and/or concomitant AMH administration, these mice were mated with fertile male. After 15 weeks, the cumulative number of pups did not differ between groups. Nevertheless, the number of ovulated eggs after ovarian stimulation was significantly reduced in Cy-treated mice and rescued by AMH co-administration. The duration of this experiment as well as the dose of Cy administered were probably not sufficient to induce a total premature depletion of PMF content into ovaries and subsequent infertility. Indeed, menopause occurs around 50 years in women whereas mouse does not exhibit such a limited reproductive lifespan, so that it can be more difficult to promote chemotherapy-induced

menopause in mouse models. Thus, these results highlight that fertility is probably not only related to ovarian reserve, as it has been already demonstrated in women (31).

Overall, in this pubertal mouse model, our results provide new evidence that AMH inhibits PMF recruitment and could therefore protect mice from Cy-induced gonadotoxicity. Nevertheless, molecular mechanisms underlying these effects are not fully understood yet. The exploration of PI3K signaling pathway interestingly showed that the phosphorylation of FOXO3A was significantly low in mouse ovaries treated with AMH. FOXO3A is expressed in the nucleus of PMF and plays an essential role for the maintenance of PMF at a dormant state (1). This was highlighted in *Foxo3a*^{-/-} mice which exhibit a global follicular activation leading to oocyte death and early depletion of ovarian reserve (32). Moreover, it has been shown that phosphorylation of FOXO3A induces the protein nuclear export, leading to PMF activation (2). Accordingly, FOXO3A is localized in the PMF nucleus after AMH treatment suggesting that, by preventing cytoplasmic shuttling of FOXO3A during chemotherapy, AMH might prevent PMF activation.

Recently, a few studies suggested the involvement of autophagy in the regulation of PMF ovarian reserve. This mechanism is an ubiquitous process implicated in cell homeostasis and involved in maintaining the primordial oocyte pool in murine newborns ovaries (33, 34). This role in ovary was demonstrated by genetically modified mouse models showing that the inhibition of autophagy resulted in an over loss of germ cells at birth and a significantly reduced ovarian reserve in adult mutant animals (21, 35). Moreover, activation of autophagy by pharmacological agent as rapamycin is able to preserve the follicle pool reserve and to prolong the ovarian lifespan of female rats *via* modulating mTOR (36). Indeed, mTOR, a substratum of PI3K pathway is the main known regulator of this process (37). In accordance with these results, we showed that Cy activated PI3K pathway, inhibited autophagy and induced depletion of ovarian reserve. Interestingly, AMH administration was able to induce autophagy in ovaries. Since PI3K signaling pathway is not activated by AMH administration, a possible mechanism to explain modulation of AMH-induced autophagy might implicated FOXO3A. Indeed, on the one hand we showed that FOXO3A phosphorylation was regulated by AMH and on the other, this factor was shown to be related to autophagy activation (38). Therefore, these various findings led us to hypothesize a close relationship between AMH and autophagy to protect PMF stockpile and to limit follicular depletion induced by Cy.

Our results, in accordance with a very recent study (29), revealed that AMH might represent a treatment limiting PMF depletion induced by Cy. Therefore, it could be a new option for preserving fertility of women having to receive alkylating nitrogen mustard treatment.

Currently, in the field of oncofertility, efforts are constantly made to improve existing FP techniques and to develop new strategies suitable for patients whatever age and ovarian reserve status (39). Thus, several “fertoprotectant” molecules, as rapamycin, have been developed and studied to limit chemotherapy-induced ovarian damages in mice (14, 18, 27). However, these treatments are involved in cell death mechanism or in ubiquitous signaling pathways and could therefore interfere with the efficacy of treatment or other physiological mechanisms (14). Nevertheless, in order to be applied in clinical practice, these agents should not decreased the anti-cancer activity of the chemotherapy drugs nor preserved genetically comprised oocytes. Since, AMH is only produced by ovaries and acts through its specific receptor mainly expressed by ovaries, this peptide might be a particularly interesting new candidate to protect ovarian reserve and subsequent fertility as it acts as a targeted therapy.

References

1. Reddy, P., Zheng, W., and Liu, K. (2010) Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **21**, 96–103
2. Adhikari, D. and Liu, K. (2009) Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr. Rev.* **30**, 438–464
3. Hsueh, A. J. W., Kawamura, K., Cheng, Y., and Fauser, B. C. J. M. (2015) Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr. Rev.* **36**, 1–24
4. Visser, J. A. and Themmen, A. P. N. (2014) Role of anti-Müllerian hormone and bone morphogenetic proteins in the regulation of FSH sensitivity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **382**, 460–465
5. Durlinger, A. L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., and Themmen, A. P. (1999) Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* **140**, 5789–5796
6. Carlsson, I. B., Scott, J. E., Visser, J. A., Ritvos, O., Themmen, A. P. N., and Hovatta, O. (2006) Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **21**, 2223–2227
7. Yang, M. Y., Cushman, R. A., and Fortune, J. E. (2017) Anti-Müllerian hormone inhibits activation and growth of bovine ovarian follicles in vitro and is localized to growing follicles. *Mol. Hum. Reprod.* 1–10
8. Nilsson, E., Rogers, N., and Skinner, M. K. (2007) Actions of anti-Mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reprod. Camb. Engl.* **134**, 209–221
9. Durlinger, A. L. L., Gruijters, M. J. G., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., Uilenbroek, J. T. J., Grootegoed, J. A., and Themmen, A. P. N. (2002) Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* **143**, 1076–1084
10. Gigli, I., Cushman, R. A., Wahl, C. M., and Fortune, J. E. (2005) Evidence for a role for anti-Mullerian hormone in the suppression of follicle activation in mouse ovaries and bovine ovarian cortex grafted beneath the chick chorioallantoic membrane. *Mol. Reprod. Dev.* **71**, 480–488
11. De Vos, M., Devroey, P., and Fauser, B. C. J. M. (2010) Primary ovarian insufficiency. *Lancet Lond. Engl.* **376**, 911–921
12. Donnez, J., Martinez-Madrid, B., Jadoul, P., Van Langendonck, A., Demylle, D., and Dolmans, M.-M. (2006) Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum. Reprod. Update* **12**, 519–535
13. Bedoschi, G., Navarro, P. A., and Oktay, K. (2016) Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact. *Future Oncol. Lond. Engl.* **12**, 2333–2344
14. Roness, H., Kalich-Philosoph, L., and Meirou, D. (2014) Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: possible roles for hormonal and non-hormonal attenuating agents. *Hum. Reprod. Update* **20**, 759–774
15. Morgan, S., Anderson, R. A., Gourley, C., Wallace, W. H., and Spears, N. (2012) How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum. Reprod. Update* **18**, 525–535
16. Assi, J., Santos, J., Bonetti, T., Serafini, P. C., Motta, E. L. A., and Chehin, M. B. (2018) Psychosocial benefits of fertility preservation for young cancer patients. *J. Assist. Reprod. Genet.*
17. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. (2013) Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil. Steril.* **100**, 1214–1223

18. Fisch, B. and Abir, R. (2018) Female fertility preservation: past, present and future. *Reprod. Camb. Engl.*
19. Sonigo, C., Bouilly, J., Carré, N., Tolle, V., Caraty, A., Tello, J., Simony-Conesa, F.-J., Millar, R., Young, J., and Binart, N. (2012) Hyperprolactinemia-induced ovarian acyclicity is reversed by kisspeptin administration. *J. Clin. Invest.* **122**, 3791–3795
20. Pedersen, T. and Peters, H. (1968) Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.* **17**, 555–557
21. Gawriluk, T. R., Hale, A. N., Flaws, J. A., Dillon, C. P., Green, D. R., and Rucker, E. B. (2011) Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary. *Reprod. Camb. Engl.* **141**, 759–765
22. Gannon, A. M., Stämpfli, M. R., and Foster, W. G. (2012) Cigarette smoke exposure leads to follicle loss via an alternative ovarian cell death pathway in a mouse model. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **125**, 274–284
23. Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., et al. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**, 1–222
24. Meirow, D., Lewis, H., Nugent, D., and Epstein, M. (1999) Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **14**, 1903–1907
25. Kalich-Philosoph, L., Roness, H., Carmely, A., Fishel-Bartal, M., Ligumsky, H., Paglin, S., Wolf, I., Kanety, H., Sredni, B., and Meirow, D. (2013) Cyclophosphamide triggers follicle activation and “burnout”; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Sci. Transl. Med.* **5**, 185ra62
26. Chang, E. M., Lim, E., Yoon, S., Jeong, K., Bae, S., Lee, D. R., Yoon, T. K., Choi, Y., and Lee, W. S. (2015) Cisplatin Induces Overactivation of the Dormant Primordial Follicle through PTEN/AKT/FOXO3a Pathway which Leads to Loss of Ovarian Reserve in Mice. *PLoS One* **10**, e0144245
27. Zhou, L., Xie, Y., Li, S., Liang, Y., Qiu, Q., Lin, H., and Zhang, Q. (2017) Rapamycin Prevents cyclophosphamide-induced Over-activation of Primordial Follicle pool through PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in vivo. *J. Ovarian Res.* **10**, 56
28. Hayes, E., Kushnir, V., Ma, X., Biswas, A., Prizant, H., Gleicher, N., and Sen, A. (2016) Intra-cellular mechanism of Anti-Müllerian hormone (AMH) in regulation of follicular development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **433**, 56–65
29. Kano, M., Sosulski, A. E., Zhang, L., Saatcioglu, H. D., Wang, D., Nagykerly, N., Sabatini, M. E., Gao, G., Donahoe, P. K., and Pépin, D. (2017) AMH/MIS as a contraceptive that protects the ovarian reserve during chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E1688–E1697
30. Durlinger, A. L., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T. R., Matzuk, M. M., Rose, U. M., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., and Themmen, A. P. (2001) Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* **142**, 4891–4899
31. Steiner, A. Z., Pritchard, D., Stanczyk, F. Z., Kesner, J. S., Meadows, J. W., Herring, A. H., and Baird, D. D. (2017) Association Between Biomarkers of Ovarian Reserve and Infertility Among Older Women of Reproductive Age. *JAMA* **318**, 1367–1376
32. Castrillon, D. H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J. W., and DePinho, R. A. (2003) Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* **301**, 215–218
33. Sun, Y.-C., Wang, Y.-Y., Sun, X.-F., Cheng, S.-F., Li, L., Zhao, Y., Shen, W., and Chen, H. (2018) The role of autophagy during murine primordial follicle assembly. *Aging* **10**, 197–211

34. Sun, Y.-C., Sun, X.-F., Dyce, P. W., Shen, W., and Chen, H. (2017) The role of germ cell loss during primordial follicle assembly: a review of current advances. *Int. J. Biol. Sci.* **13**, 449–457
35. Song, Z.-H., Yu, H.-Y., Wang, P., Mao, G.-K., Liu, W.-X., Li, M.-N., Wang, H.-N., Shang, Y.-L., Liu, C., Xu, Z.-L., Sun, Q.-Y., and Li, W. (2015) Germ cell-specific Atg7 knockout results in primary ovarian insufficiency in female mice. *Cell Death Dis.* **6**, e1589
36. Zhang, X., Li, L., Xu, J., Wang, N., Liu, W., Lin, X., Fu, Y., and Luo, L. (2013) Rapamycin preserves the follicle pool reserve and prolongs the ovarian lifespan of female rats via modulating mTOR activation and sirtuin expression. *Gene* **523**, 82–87
37. Rabanal-Ruiz, Y., Otten, E. G., and Korolchuk, V. I. (2017) mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays Biochem.* **61**, 565–584
38. Warr, M. R., Binnewies, M., Flach, J., Reynaud, D., Garg, T., Malhotra, R., Debnath, J., and Passegué, E. (2013) FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* **494**, 323–327
39. Woodruff, T. K. (2009) Preserving fertility during cancer treatment. *Nat. Med.* **15**, 1124–1125

Author Contributions

CS, IB, MG and NB designed research; CS and IB performed research; CS and IB analyzed data. CS, IB and NB wrote the paper. MG carefully revised the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Nathalie Ba and Olivier Trassard (Institut Biomédical de Recherche UMS 32, Plateau d'imagerie, Histologie de Recherche, le Kremlin-Bicêtre, France) for assistance in pathological proceedings and slides scanning.

Funding

Funding was from Plan Cancer 2014-2019. This work was supported by grants from Canceropole Ile de France/INCA, Convention de recherche 2015-1-EMERG-02-INSERM11-1.

Conflict of Interest statement: None declared

Figures Legends

Figure 1. Effect of cyclophosphamide intra-peritoneal injection on mouse ovaries. Six-week-old female mice received one intra-peritoneal injection of vehicle (Control) or 150mg/kg cyclophosphamide (Cy). *A*) Histological analysis of ovarian sections 8 days after injection (n=5/group). Representative middle section and high magnification of control and Cy treated ovary. Black and white arrows indicate primordial follicles and growing follicles respectively. Bar scales are indicated. *B*) Primordial follicles (PMF) and early growing follicle (EGF) are counted from ovaries of control and Cy treated mice. The ratio of PMF or EGF to the total number of follicles is calculated for each group. *C*) Representative Western blot analysis of PI3K signaling proteins (AKT, P70S6K and FOXO3A) and actin from ovaries 24 hours after injection of vehicle or Cy. Graphs represent the quantification of phospho-proteins from three to five independent experiments * p<0.05

Figure 2. AMH tones down cyclophosphamide-induced follicular depletion in ovary. Six-week-old female mice received one intra-peritoneal injection of vehicle (Control) or cyclophosphamide (Cy) (150mg/kg) with or without recombinant AMH (5mg/kg). *A*) Histological analysis of ovaries 8 days after injection (n=12/group). Representative section and high magnification of control, Cy, Cy+AMH and AMH treated ovaries. White arrows indicate growing follicles and black arrows show primordial follicles. *B*) Total number of primordial follicles (PMF) per ovary (left panel) and ratio of PMF to total number of follicles (right panel) in each group. *C*) Total number of early growing follicles (EGF) per ovary and ratio of EGF to total number of follicles in each group. * p<0.05 , ** p<0.01 , *** p<0.001

Figure 3. Effect of AMH on PI3K pathway. *A*) The ovaries collected 24 hours after the injection were lysed and the PI3K signaling proteins (pAKT, pP70S6K and pFOXO3A) were analyzed by Western blot. . *B*) The graph shows the quantification of phosphorylated proteins in each condition standardized with respect to actin used as loading control Western Blot were repeated three to five times. * p<0.05 , ** p<0.01 , *** p<0.001. *C*) Subcellular localization of FOXO3A within a primordial follicle in AMH or Cy-treated group. Ovarian sections from mouse injected with Cy or AMH were immunostained for FOXO3A. Nuclei were labelled with DAPI. FOXO3A is mainly present into the cytoplasm of oocyte in Cy-treated group whereas it is nuclear in the AMH-treated group.

Figure 4. Fertility trial on a 32 weeks period after treatment. Six-week-old female mice (n=6/group) were treated with one intra-peritoneal injection/week of vehicle, Cy (75mg/kg) with or without recombinant AMH (0.5mg/kg). *A*) Experimental design. Estrous cycles were monitored during 7 weeks then mice were mated after treatment withdrawal in order to study their fertility during 15 weeks. Four weeks after male removing, female mice were injected with PMSG and animals were sacrificed 17 h after LH injection. *B*) Estrous cyclicity was monitored by daily vaginal smear. Left panel is a representative estrous cycle of one animal/group. Each phase of cycle is indicated (E: estrus, P: proestrus, D: diestrus and M: metestrus). Right panel represents the number of cycles per mouse during 56 days in control and each treated group (mean±SEM). * p<0.05, ** p<0.01.

Figure 5. Evaluation of long-term effect of treatment on fertility. *A*) Continuous breeding assay starting at 13 weeks of age, showing cumulative number of progeny per female. The number of pups of each animal was counted. Pups were removed 2 to 5 days after birth. Graph represents the cumulative number of pups per female in each group over 15 weeks (n=6/group). *B*) 32-week-old mice were injected with PMSG and after ovulation triggering, animals were sacrificed and the number of oocytes recovered in the ampulla was counted. Graph represents the mean ± SEM number of eggs per female after superovulation. * p<0.05.

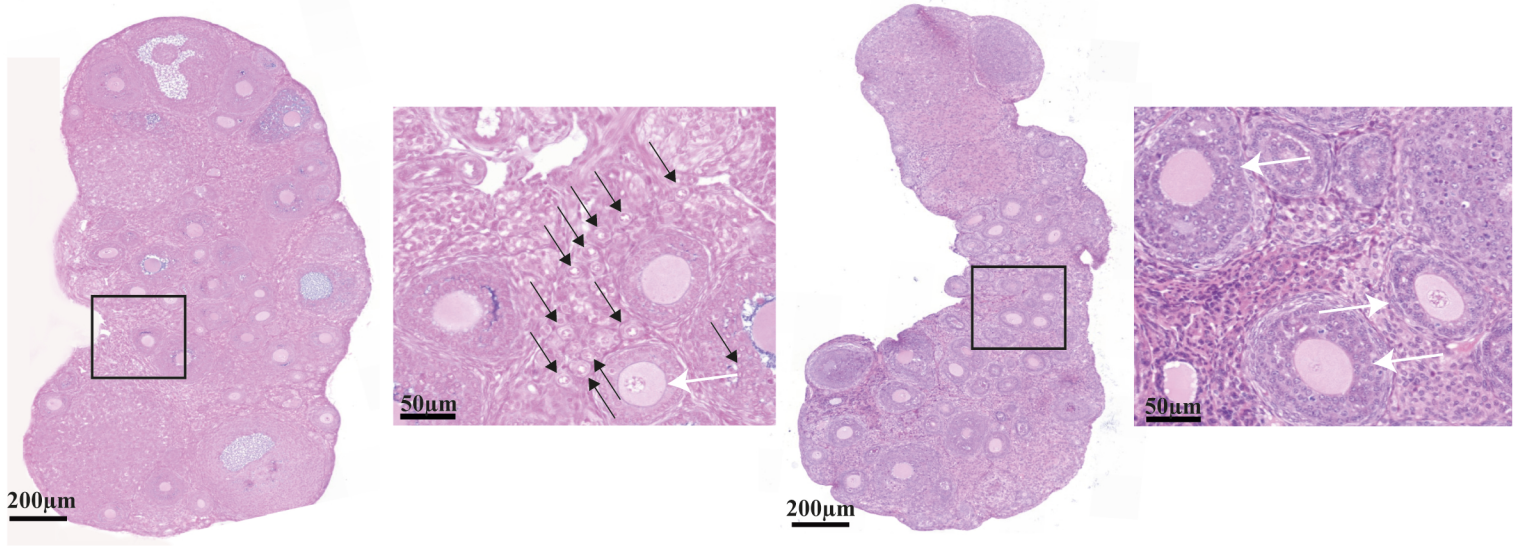
Figure 6. AMH induces autophagy. Mice were treated with vehicle or intraperitoneal injection of Cy, Cy+AMH or AMH for 24 h and then euthanized. Ovaries lysates were subjected to immunoblotting analyses using anti-LC3, anti-p62 and anti-actin antibodies. LC3-II/actin and p62/actin ratios were determined by densitometry from n = 3 independent experiments.

Figure 1

A

Control

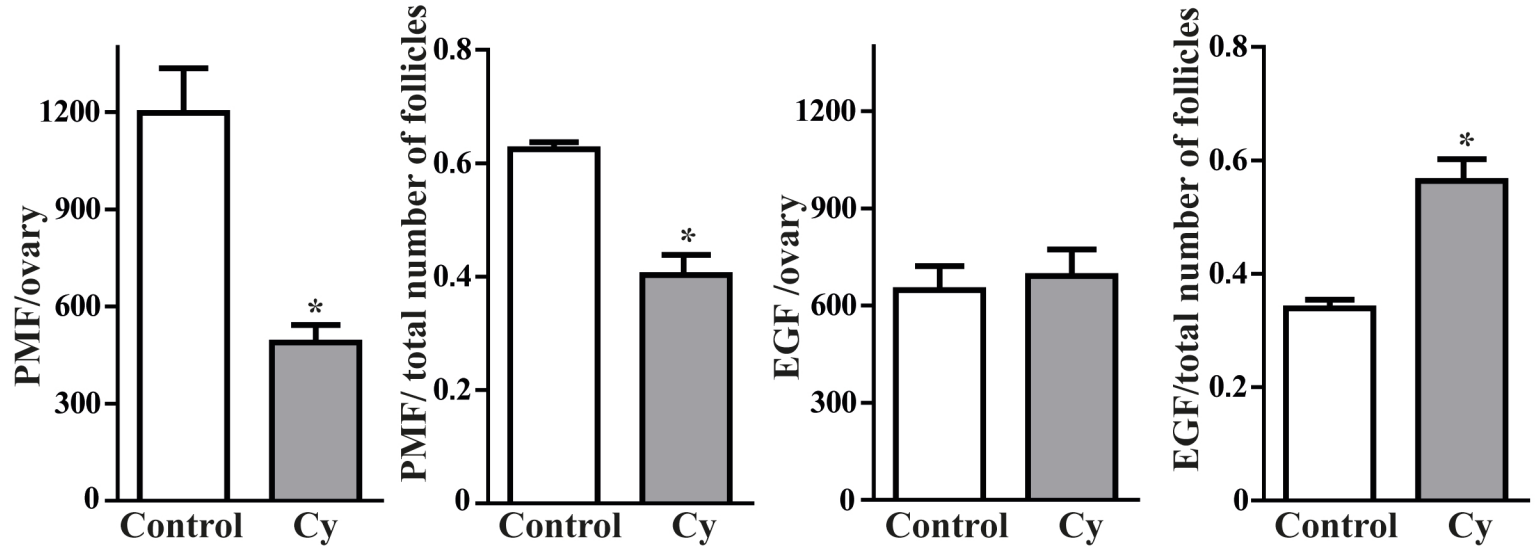
Cy



B

Primordial Follicles

Early Growing Follicles



C

Control Cy

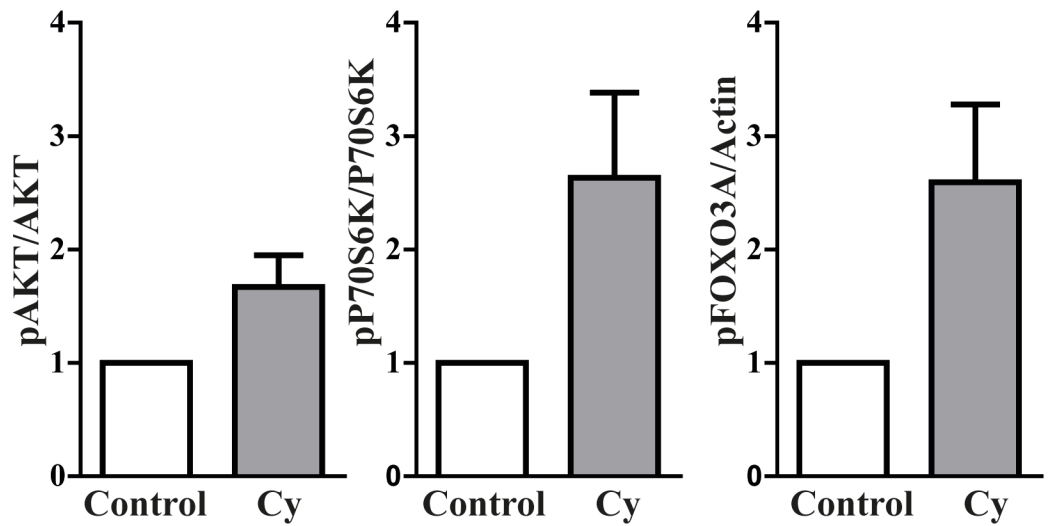
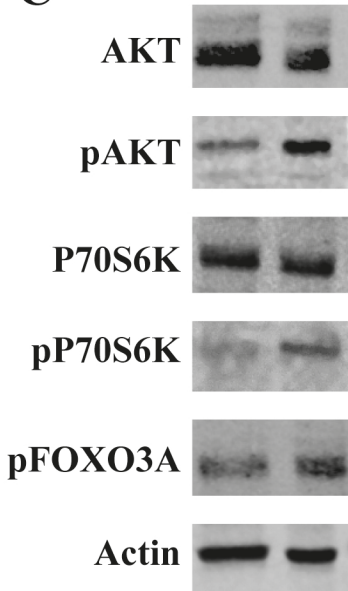


Figure 2

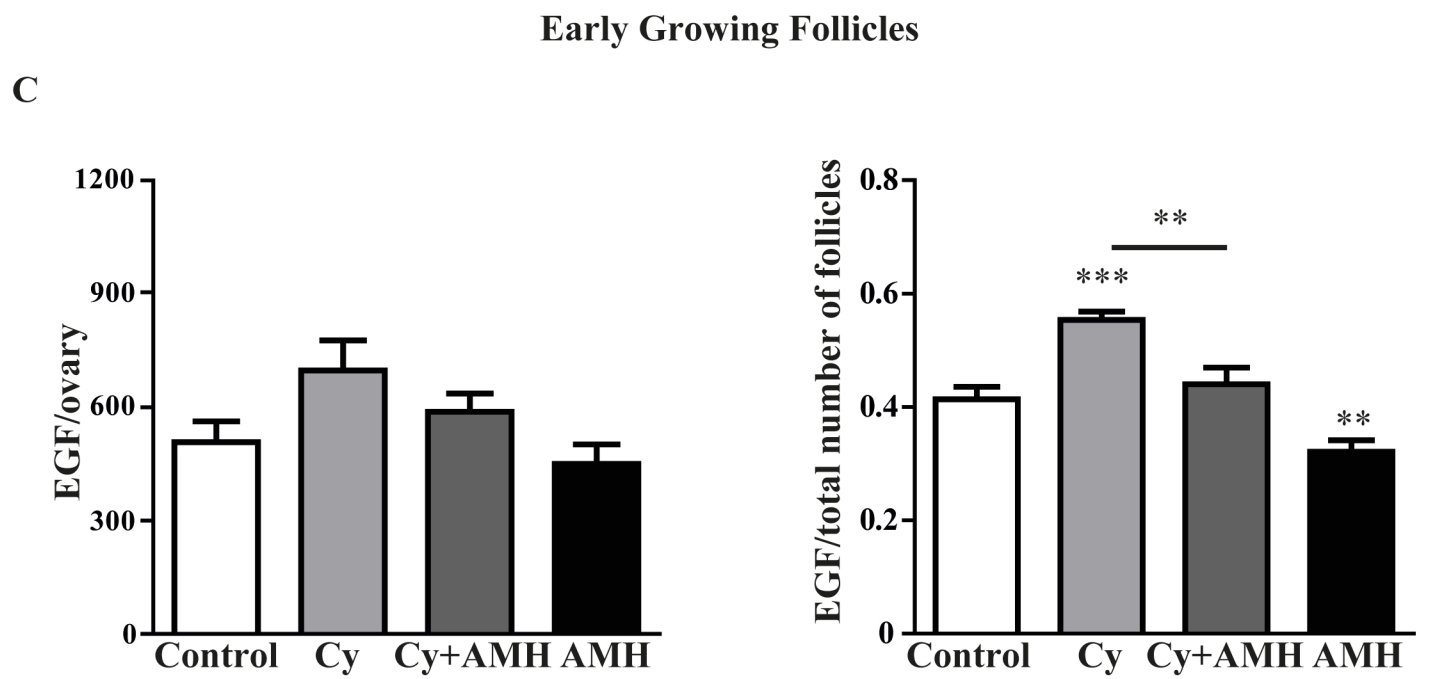
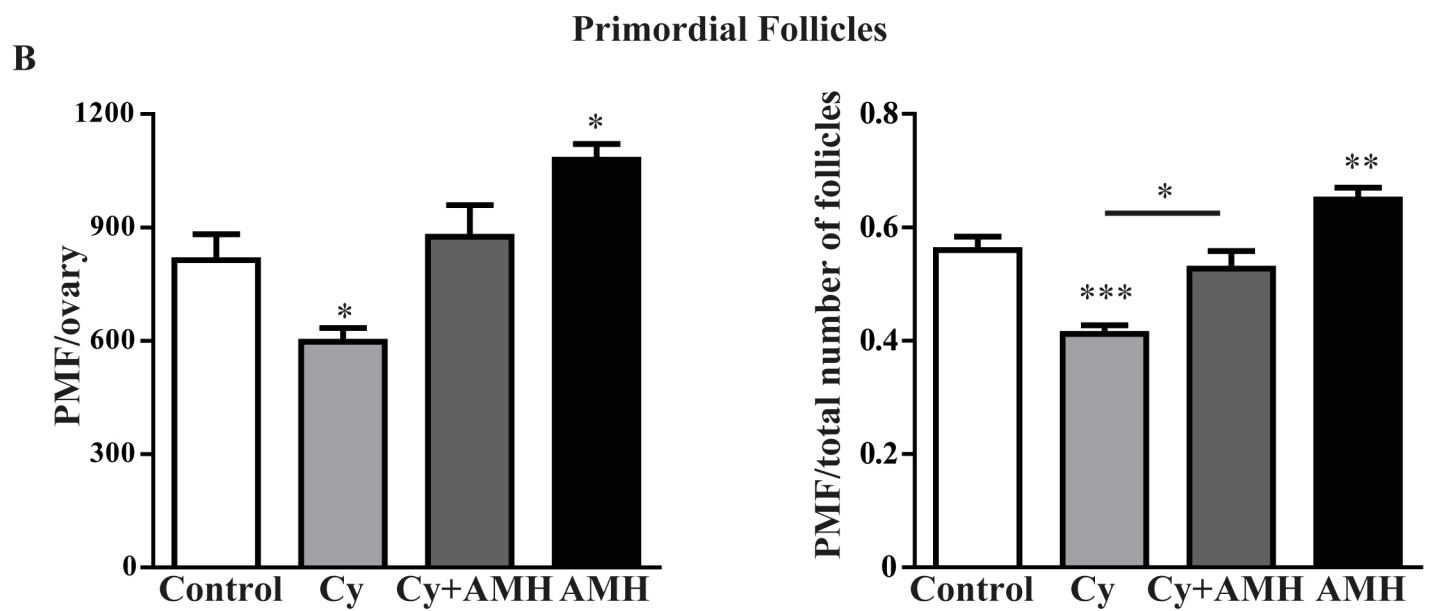
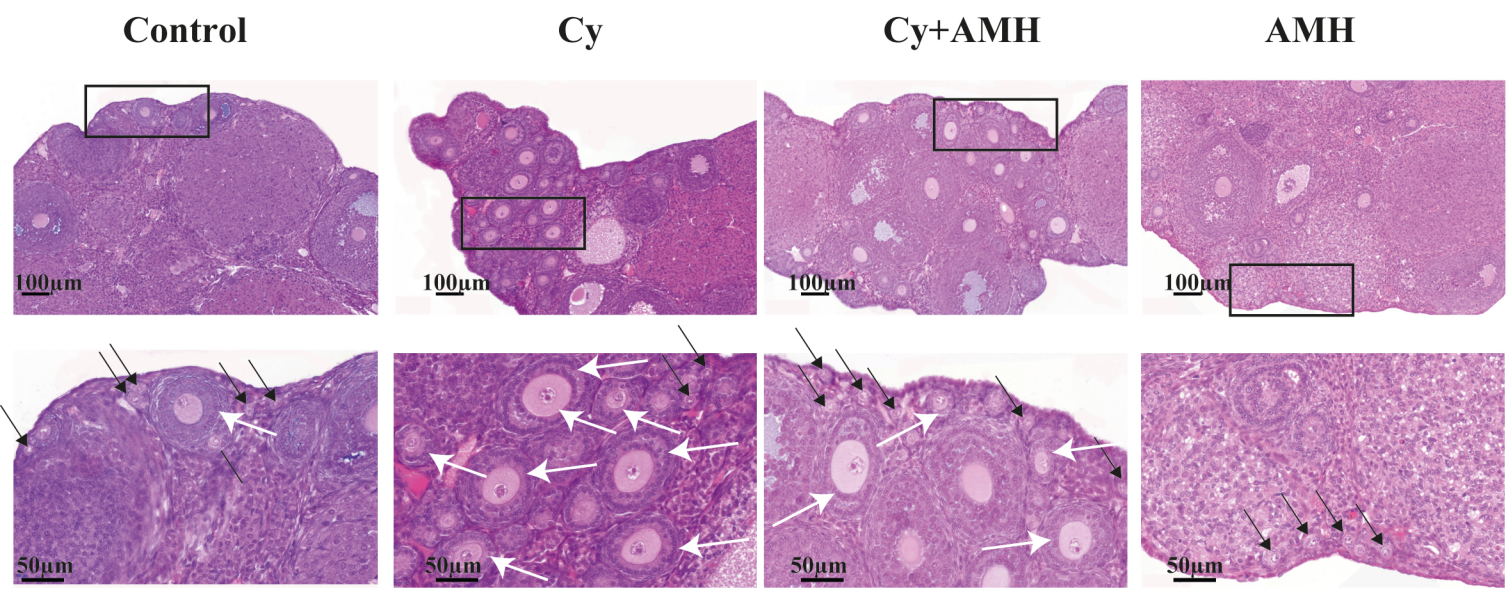
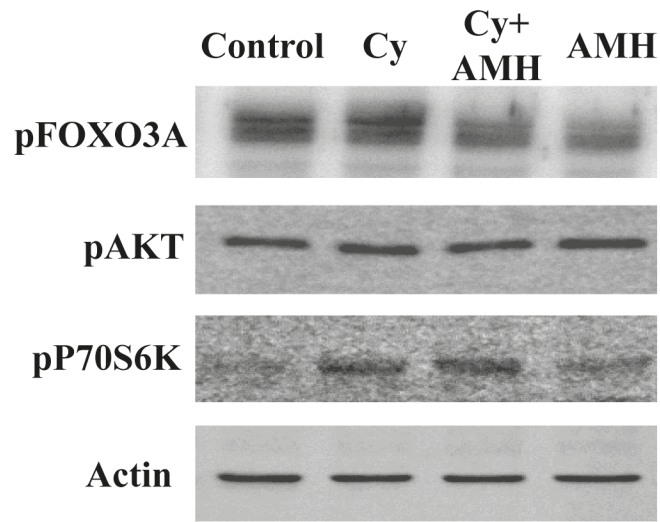
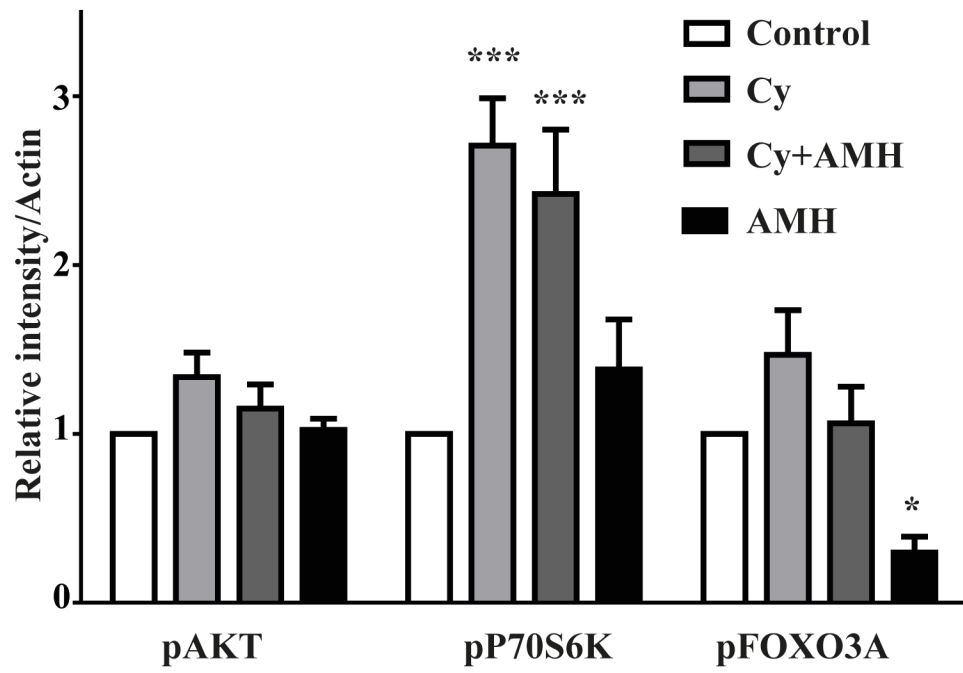


Figure 3

A



B



C

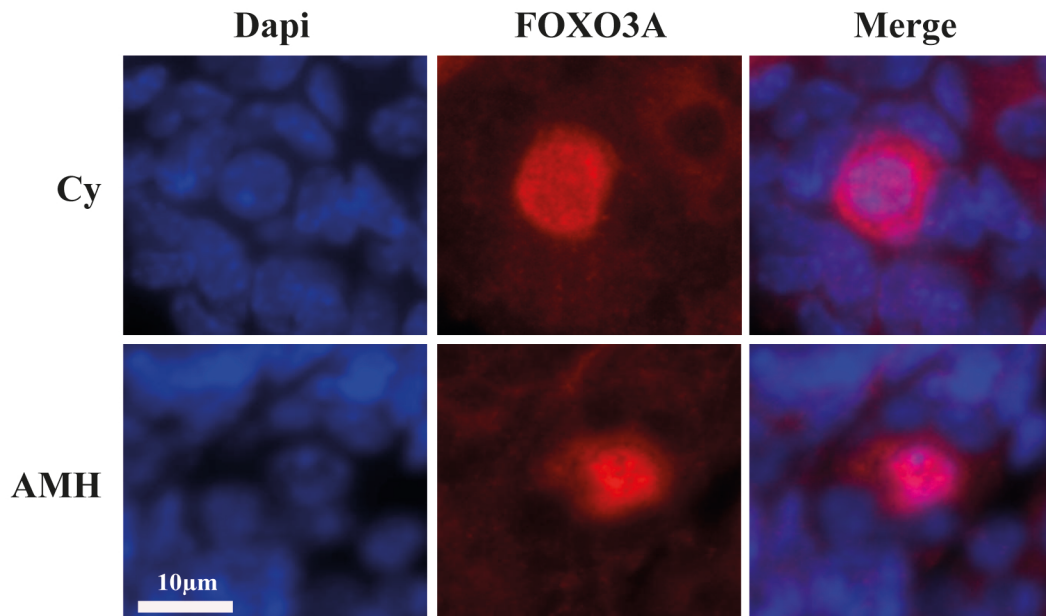
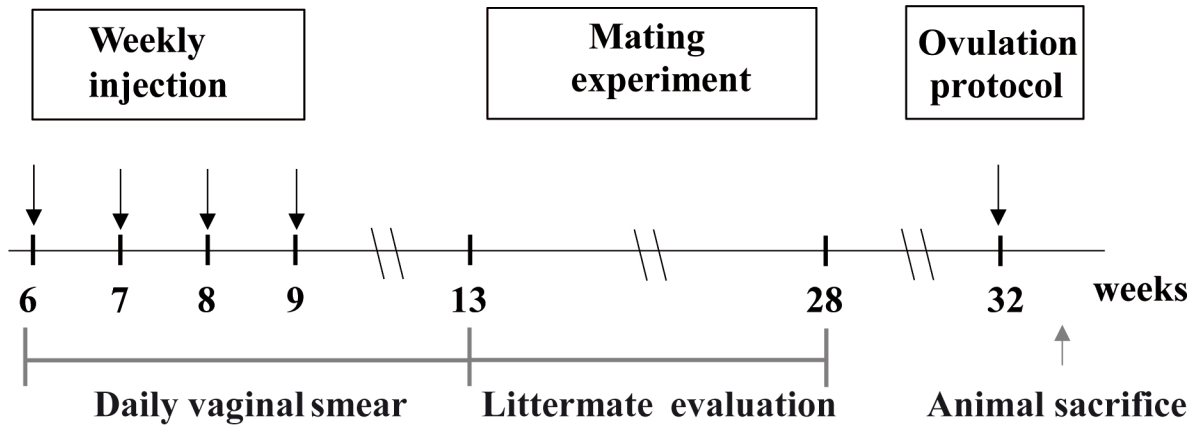


Figure 4

A

Fertility study group



B

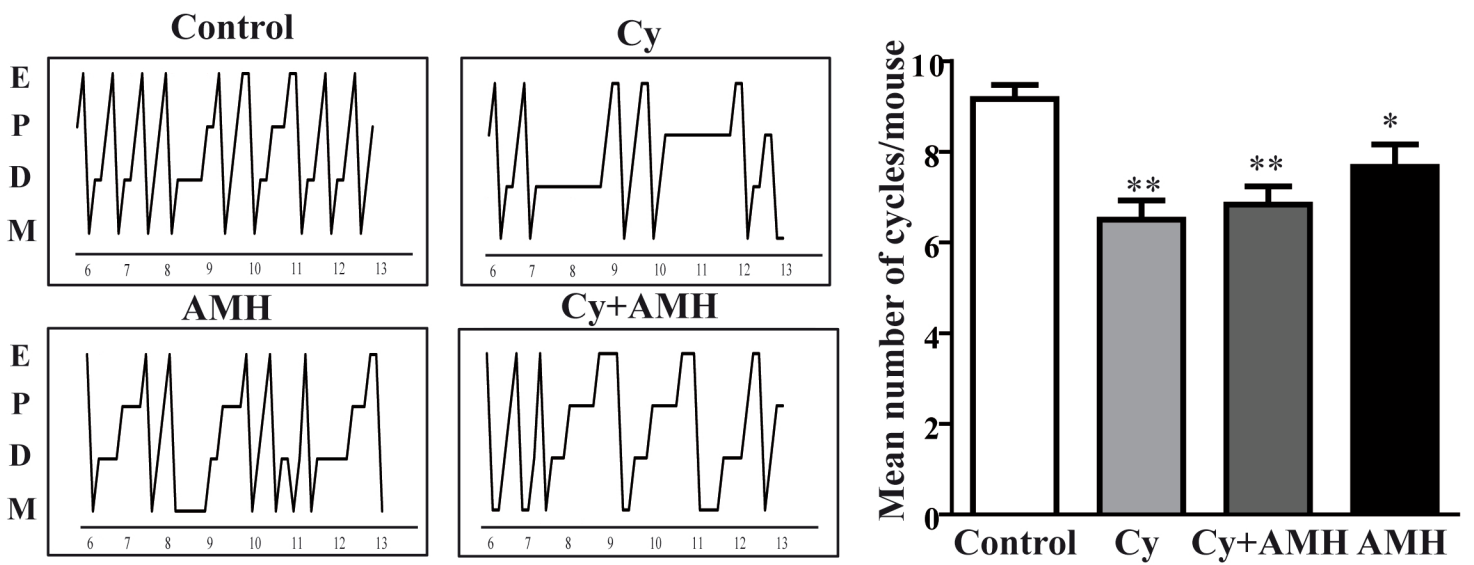
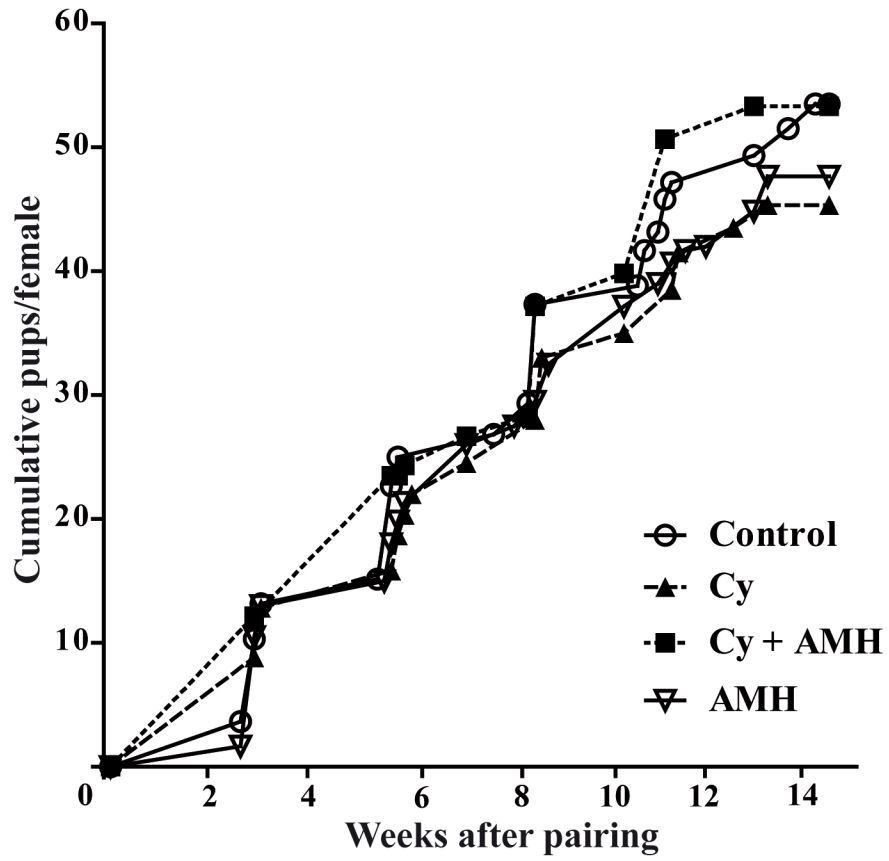


Figure 5

A



B

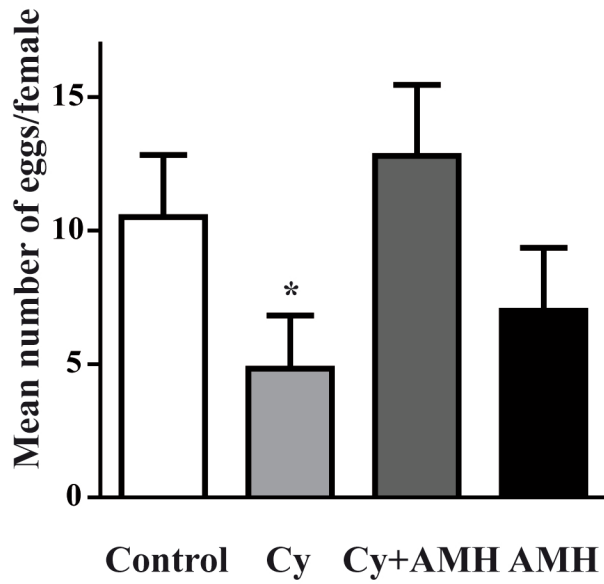
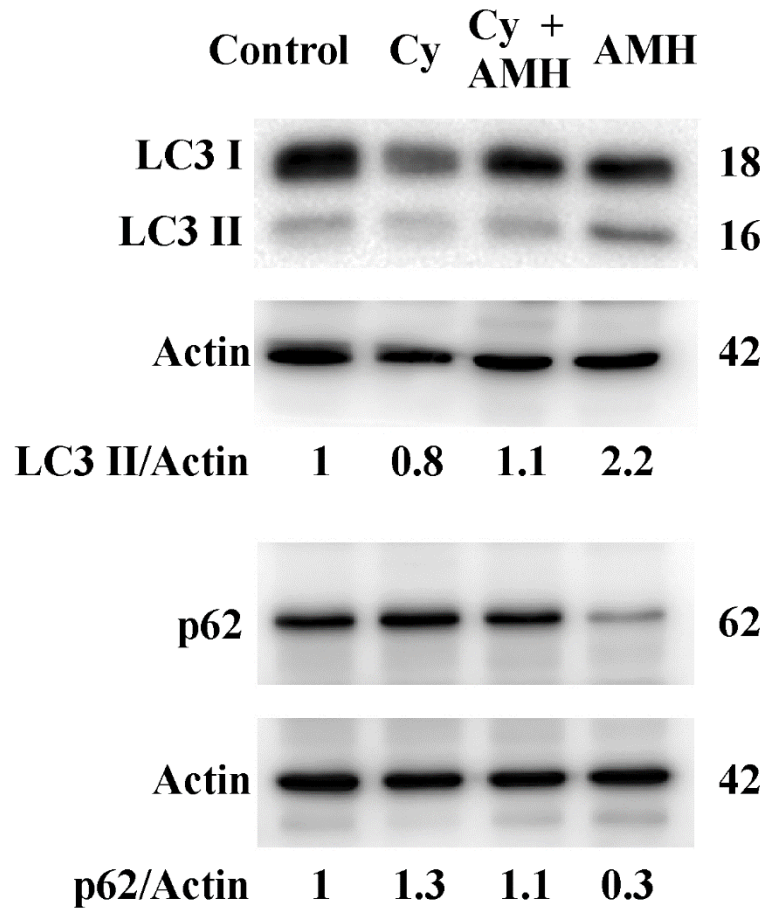


Figure 6



C. Discussion et perspectives

Dans ce travail, nous avons commencé par étudier le mécanisme de la gonadotoxicité du Cy dans un modèle de souris pubères. A ce jour, il existe dans la littérature plusieurs mécanismes expliquant l'altération de la réserve ovarienne secondaire à cette chimiothérapie (Morgan *et al.*, 2012; Roness *et al.*, 2016). Récemment, la théorie du « burn-out », selon laquelle le Cy induit une déplétion folliculaire secondaire à une entrée en croissance massive des follicules primordiaux a été proposée par Kalich-Philosoph *et al.*, celle-ci nous semblait particulièrement intéressante (Kalich-Philosoph *et al.*, 2013). Au début de ma thèse cette équipe israélienne était la seule à avoir mis en évidence ce mécanisme. Ainsi, dans un premier temps, nous avons montré qu'une injection de Cy induisait une diminution du nombre de follicules primordiaux ainsi qu'une augmentation de la proportion des follicules en croissance. De plus, toujours en accord avec les travaux de Kalich-Philosoph *et al.*, nous avons confirmé que le Cy était à l'origine d'une activation de la voie PI3K, révélée par une augmentation de la phosphorylation des principaux acteurs de cette voie, AKT, P70S6K et FOXO3A. Cette étape était un pré-requis essentiel afin de pouvoir tester notre hypothèse de protection de la réserve ovarienne par l'AMH. Depuis 2014, ce mécanisme a été confirmé par plusieurs équipes et pour plusieurs types d'agents chimiothérapeutiques tels que le cisplatine ou la doxorubicine (Chang *et al.*, 2015; Kano *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2017).

Notre hypothèse principale était donc que l'AMH, connue pour inhiber l'entrée en croissance des follicules primordiaux, pourrait permettre de limiter la déplétion folliculaire secondaire au traitement par Cy. De manière originale, nous avons choisi de travailler sur un modèle de souris pubères traitées *in vivo* par des injections intra-péritonéales de Cy en association ou non à de l'AMH recombinante. Au début de cette étude, la fonction et la réserve ovariennes n'avaient jamais été évaluées chez la souris après des injections d'AMH recombinante *in vivo*. En effet, les rôles physiologiques de l'AMH sur l'ovaire ont en été révélés grâce à d'autres modèles expérimentaux, développés dans la partie « état des connaissances » de ce manuscrit (Durlinger *et al.*, 2002a; Gigli *et al.*, 2005). Dans notre étude nous avons mis en évidence qu'une injection d'AMH recombinante (100 µg par souris, soit 5 mg/kg) permettait effectivement de limiter la déplétion folliculaire induite par le Cy. Par ailleurs, lorsque l'AMH était administrée seule, nous avons montré une augmentation du nombre total de follicule primordiaux associé à une diminution de la proportion de follicules en croissance, confirmant ainsi, dans ce modèle, le rôle de l'AMH comme inhibiteur de l'activation folliculaire.

Pendant la réalisation de ce travail, deux équipes distinctes ont également évalué les effets, sur la fonction ovarienne, d'injections intra-péritonéales d'AMH recombinante à des souris

Résultats

sauvages (Hayes *et al.*, 2016; Kano *et al.*, 2017). Dans la première étude, une administration quotidienne d'AMH recombinante (120 ou 300 ng/jour) a été réalisée chez des souris pubères et non pubères pendant 4 semaines. L'analyse histologique des ovaires à la fin du traitement montrait une augmentation du pourcentage de follicules primordiaux et primaires et une diminution du pourcentage des follicules antraux et atrétiques chez les souris traitées par AMH. Ces résultats viennent conforter l'effet inhibiteur de l'AMH sur l'activation folliculaire. Cependant, le comptage des follicules est exprimé en pourcentage, ce qui rend impossible la comparaison des résultats avec les données de la littérature (Hayes *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'analyse des frottis vaginaux des animaux a révélé une altération des cycles œstriens lorsque les souris étaient traitées par la plus forte dose d'AMH (300ng/jour). En association avec la diminution de l'expression des gènes régulés par la FSH (*StAR*, *LHR* et *aromatase*), ces résultats confirment le rôle inhibiteur de l'AMH sur l'action de la FSH dans les follicules en croissance. Dans la seconde étude, Kano *et al.* ont évalué plusieurs modes d'administration de l'AMH chez des souris pubères (Kano *et al.*, 2017). Les souris recevant une dose supra-physiologique d'AMH par méthode virale ou après des injections répétées d'AMH recombinante (1,5mg/kg 2 fois par jour) présentaient une altération de la cyclicité après 35 jours de traitement ainsi qu'un petit nombre de souriceaux après accouplement. L'analyse histologique des ovaires après 40 jours de traitement mettait en évidence une diminution du nombre de follicules en croissance et de follicules atrétiques mais une réserve ovarienne comparable à celle des souris contrôles. La folliculogenèse reprenait normalement lorsque le traitement par AMH recombinante était interrompu ou lorsque les ovaires des souris traitées par thérapie génique étaient greffés chez des souris sauvages. Ces résultats ont permis de confirmer que l'action inhibitrice de l'AMH sur l'entrée en croissance des follicules de réserve était réversible *in vivo*. Enfin, dans une dernière série d'expériences, ces auteurs ont montré qu'un traitement par AMH permettait de limiter la déplétion folliculaire induite par 2 injections de chimiothérapie (carboplatine, doxorubicine ou cy) espacées d'une semaine (Kano *et al.*, 2017).

Les résultats que nous avons obtenus viennent conforter les données publiées par ces 2 équipes mais avec une dose et un mode d'administration de l'AMH différents. Des études complémentaires visant à évaluer la dose minimale efficace d'AMH pour limiter la déplétion folliculaire liée à la chimiothérapie sont donc nécessaires. De plus, ces données permettent de suggérer que l'AMH recombinante pourrait devenir un nouveau traitement dans le domaine de la fertilité. La place de l'AMH recombinante dans l'arsenal thérapeutique de la préservation de la fertilité ainsi que les autres indications possibles seront discutées dans la discussion générale de ce manuscrit.

Résultats

Si ces différentes données ont permis de confirmer divers rôles de l'AMH au cours de la folliculogénèse, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de l'entrée en croissance des follicules primordiaux ne sont, à ce jour, pas connus. A notre connaissance, seule une étude a cherché spécifiquement à évaluer le mécanisme d'action de cette hormone dans l'inhibition de la transition des follicules primordiaux en follicules primaires par une approche transcriptomique (Nilsson *et al.*, 2007). Les résultats ont mis en évidence que l'AMH inhibait l'action stimulatrice de KITL, bFGF et KGF.

Dans ce travail, nous avons émis l'hypothèse que l'autophagie pourrait être impliquée dans la protection de la réserve ovarienne médiée par l'AMH. En effet, des études, utilisant des modèles murins génétiquement modifiés, ont suggéré l'implication de l'autophagie dans la régulation de la réserve ovarienne des follicules primordiaux (Gawriluk *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2015). De plus, l'administration de rapamycine (un inhibiteur de mTOR), molécule permettant d'activer l'autophagie, à des rats femelles pubères permet de préserver le pool folliculaire et de prolonger la durée de vie reproductive, en modulant l'activation de mTOR (Zhang *et al.*, 2013).

En association avec ces données de la littérature, les résultats obtenus au cours de cette thèse (modulation de la voie PI3K et de FOXO3A), nous ont amenés à explorer l'implication de l'autophagie dans notre modèle murin. Nous avons analysé par western blot les protéines LC3-II et p62, marqueurs de l'autophagie, dans les extraits protéiques des ovaires des différents groupes de souris utilisés dans l'étude. De manière intéressante, les résultats ont montré que le Cy induisait une diminution de l'autophagie alors que l'AMH, au contraire, activait ce processus (Figure 5 de l'Article 1). Cependant, la voie de signalisation PI3K n'était pas activée par l'administration d'AMH. Un mécanisme possible pour expliquer la modulation de l'autophagie induite par cette hormone pourrait impliquer FOXO3A, ce facteur étant connu pour être lié à l'activation de l'autophagie et au maintien de la quiescence folliculaire. Cette hypothèse est représentée dans la figure 20.

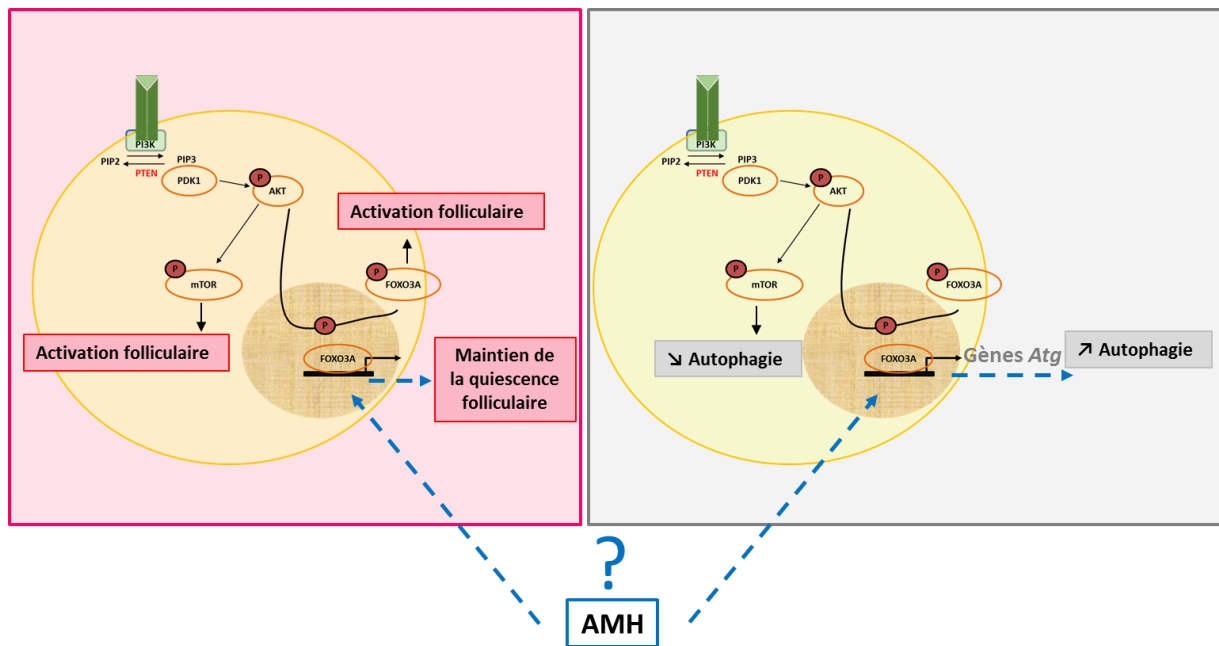


Figure 20. Hypothèse du mécanisme d'action de l'AMH pour protéger le pool folliculaire. La voie PI3K, par l'intermédiaire de mTOR et FOXO3A, est impliquée à la fois dans les mécanismes régulant l'activation folliculaire (en rose) et l'autophagie (en gris). Nous avons montré que l'AMH induisait le maintien de FOXO3A à l'état non phosphorylé, dans le noyau. Notre hypothèse est que l'AMH pourrait induire l'autophagie et maintenir la quiescence folliculaire.

Ces premiers résultats encourageants, nous ont amené à tenter de mieux comprendre comment l'AMH pouvait moduler l'autophagie et influencer le pool des follicules de réserve.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un modèle de culture cellulaire de granulosa humaine (KGN). Nous avons stimulé ces cellules avec des doses croissantes de moutarde phosphoramidate (MP), métabolite actif du cyclophosphamide en association ou non avec l'AMH recombinante. Nous avons également utilisé un agent de blocage du flux autophagique, la chloroquine (CQ), afin de mieux caractériser les variations du flux autophagique dans ce modèle. Nous n'avons pas réussi à obtenir des résultats reproductibles et interprétables avec ce système. De plus, les KGN étant des cellules de la granulosa issues de cellules épithéliales de tumeur ovarienne, une extrapolation des résultats obtenus aux follicules primordiaux aurait été difficile.

Un modèle de culture organotypique d'ovaires *in vitro* sur filtre (Transwell permeable support) a ensuite été testé. Des ovaires de souris sauvages pubères ont été prélevés à la même phase du cycle œstrien. Ces ovaires ont été traités *in vitro* par l'AMH recombinante, le métabolite actif du Cy et/ou la CQ. Les protéines étaient extraites en fin de traitement et les protéines de l'autophagie analysées par western blot. Malgré les modifications des conditions de culture (dose et durée des différents traitements), les effets des différents traitements sur l'autophagie restaient non interprétables. Plusieurs explications peuvent être proposées. Le stress, résultant du

Résultats

prélèvement puis la mise en culture des ovaires, peut induire de manière importante le processus autophagique (Van Erp *et al.*, 2017) et rendre l'impact des différents traitements difficilement analysable.

Ainsi, des études complémentaires sont nécessaires et en cours de mise en place, afin de mieux évaluer les interactions entre l'AMH et autophagie dans la protection du pool des follicules primordiaux. Plusieurs modèles expérimentaux pourraient être utilisés comme :

- Un modèle de souris pubères traitées non seulement par Cy et/ou AMH mais aussi avec CQ pour évaluer le flux autophagique et mieux caractériser ce processus autophagique.

- Un modèle de souris pré-pubères afin de s'affranchir de la probable influence hormonale au cours des différentes phases du cycle sur la régulation de l'autophagie.

- Un modèle de souris à la naissance, afin de cibler l'analyse sur le pool des follicules primordiaux. En effet, chez la souris, l'activation folliculaire démarre 3 jours après la naissance et les ovaires de nouveaux nés ne contiennent alors que des follicules primordiaux. Ce modèle serait particulièrement intéressant car plusieurs données tendent à penser que l'AMH comme l'autophagie pourraient être impliquées dans la protection du pool folliculaire au moment de cette étape de la vie (Gawriluk *et al.*, 2011; Hagen *et al.*, 2012).

En conclusion, cette étude a permis non seulement de tester une nouvelle molécule qui pourrait permettre de préserver la fertilité des femmes jeunes devant recevoir du Cy mais aussi de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'AMH sur l'ovaire de souris, impliquant possiblement l'autophagie. De manière intéressante, un travail très récent, réalisé au sein de notre laboratoire, a permis d'identifier 2 variants de gènes codant des protéines clés de l'autophagie (ATG7 et ATG9) chez 2 patientes présentant une IOP. La caractérisation fonctionnelle de ces variants a mis en évidence qu'ils altéraient le processus autophagique et pourrait être ainsi impliqués dans la déplétion folliculaire retrouvée chez ces femmes jeunes (Delcour *et al.*, soumis). En conséquence, une extrapolation des données obtenues chez la souris à la femme semble possible.

II. Deuxième partie. Comptage des follicules primordiaux par deep learning, l'intelligence artificielle au service de l'étude de la reproduction

A. Introduction

Dans le cadre de cette thèse, j'ai été amenée à évaluer le stock des follicules primordiaux chez la souris et donc à compter tous ces petits follicules présents dans les ovaires. En effet, si le dosage de l'AMH sérique murine, par technique ELISA, a été mis au point (Kevenaar *et al.*, 2006), il ne fait que refléter le nombre de petits follicules en croissance et est très peu utilisé de nos jours. Le comptage manuel des follicules primordiaux reste la méthode de référence. Cependant, ce comptage est une technique laborieuse, chronophage, dépendante de l'opérateur et donc peu reproductible comme le montre les variations très importantes observées dans la littérature (Tilly, 2003).

Afin d'analyser les différentes classes de follicules contenues dans les ovaires de souris, j'ai pu utiliser, avec l'aide d'Olivier Trassard, ingénieur sur la plateforme en imagerie à l'Inserm, un scanner de lames virtuelles qui m'a permis d'analyser les coupes histologiques d'ovaires après numérisation. Au total, j'ai compté manuellement plus de 30.000 follicules au sein de 58 ovaires. Ce travail, long et fastidieux, était néanmoins essentiel et a permis de mettre en évidence que l'AMH permettait de limiter la déplétion folliculaire liée au Cy (Article 1). L'utilisation du scanner de lames virtuelles a généré une quantité importante d'images numériques. Dans ce contexte, les techniques innovantes d'intelligence artificielle (IA) prennent toute leur place aujourd'hui et en collaboration avec la société Quantmetry, spécialisée dans les «big data», nous avons mis au point une technologie, basée sur l'apprentissage en profondeur (ou «deep learning») permettant d'identifier et de compter les follicules primordiaux de manière automatisée et rapide.

Après un rappel sur la méthodologie que j'ai utilisée pour évaluer la réserve ovarienne dans notre modèle murin et des généralités sur l'IA et le deep-learning, les résultats obtenus seront présentés dans l'article 2. Enfin, ce travail sera discuté et les perspectives évoquées.

1. Méthode d'évaluation classique de la réserve ovarienne chez la souris

Cette méthode nécessite une première étape de préparation des lames histologiques d'ovaires. Les coupes sériées de l'ovaire entier (4 μ m d'épaisseur) sont réalisées, puis une coupe sur 5 est déposée sur une lame puis colorée avec une solution classique d'hématoxyline-éosine. Au total, 8 lames, soit 60 à 70 sections, sont obtenues pour un seul ovaire. Les principales étapes de cette préparation sont schématisées dans la Figure 21.

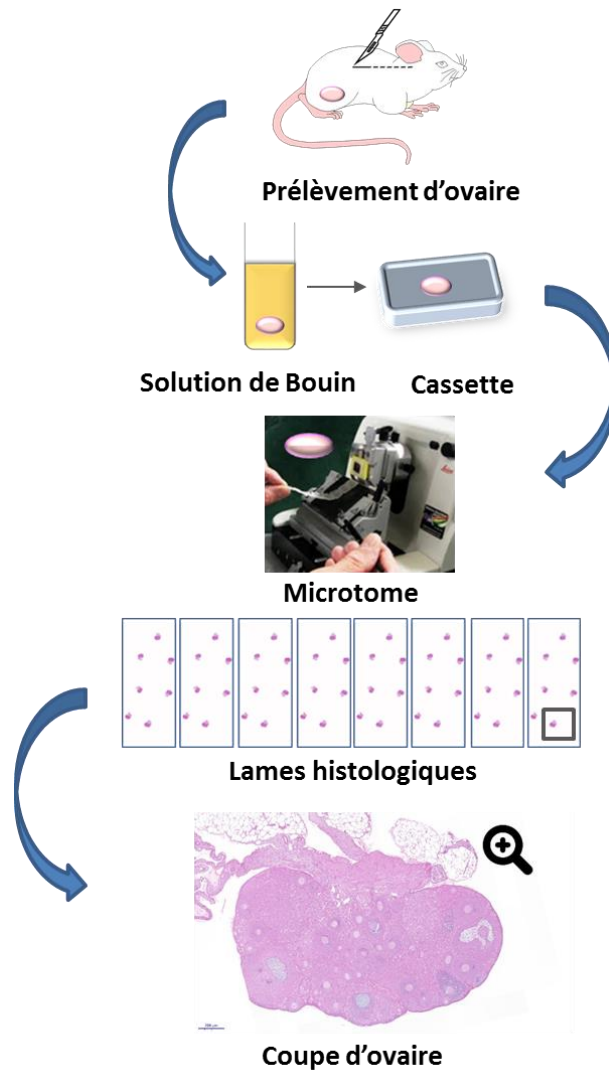


Figure 21. Etapes de préparation des coupes d'ovaires avant analyse. Les ovaires sont prélevés, fixés dans une solution de Bouin, mis en cassette puis inclus en paraffine. Les ovaires sont ensuite coupés de manière sériée dans leur totalité en coupe fine de 4 μ m. Une coupe sur 5 est posée sur une lame qui peut contenir jusqu'à 8 coupes. Enfin les lames sont colorées par une coloration classique à base d'hématoxyline éosine et peuvent être analysées une à une sur ordinateur après avoir été scannées grâce à un scanner de lame virtuelle. Le logiciel utilisé pour analyser les images est Calopix ®.

Résultats

Les coupes sont ensuite analysées et tous les follicules sont classés en fonction de leurs caractéristiques morphologiques, établies depuis de nombreuses années par Pedersen *et al.* (Pedersen and Peters, 1968). Les différents types de follicules sont représentés dans la Figure 1 de l'article 2. Classiquement, les coupes sont examinées au microscope optique à fort grossissement et chaque follicule est identifié puis compté à l'aide d'un compteur de cellules. Dans le cadre de ce projet, la mise à disposition d'un scanner de lame virtuelle par le service d'histologie de Bicêtre, dirigé par le Pr. Guettier, a permis de numériser toutes les lames puis de les analyser sur ordinateur, à l'aide d'un logiciel spécifique d'analyse d'images de microscopie, Calopix®. Ainsi, chaque follicule était identifié et annoté manuellement. Les différentes annotations obtenues étaient ensuite extraites dans un document Excel, à partir duquel le nombre de follicules de chaque catégorie pouvait être calculé. L'analyse d'une lame (soit 8 coupes) nécessitait environ 1 heure de temps, soit 8 heures pour l'évaluation d'un ovaire entier. Cette technique reste manuelle, chronophage et dépendante de l'opérateur. Réalisée sur ordinateur, elle présente cependant plusieurs avantages par rapport à la technique classique de microscopie, comme la possibilité de revoir et vérifier les images ou garder une trace des images annotées. C'est à partir de ces dernières qu'une technique de comptage automatisé utilisant l'IA a pu être mise en place.

2. Intelligence artificielle et deep learning

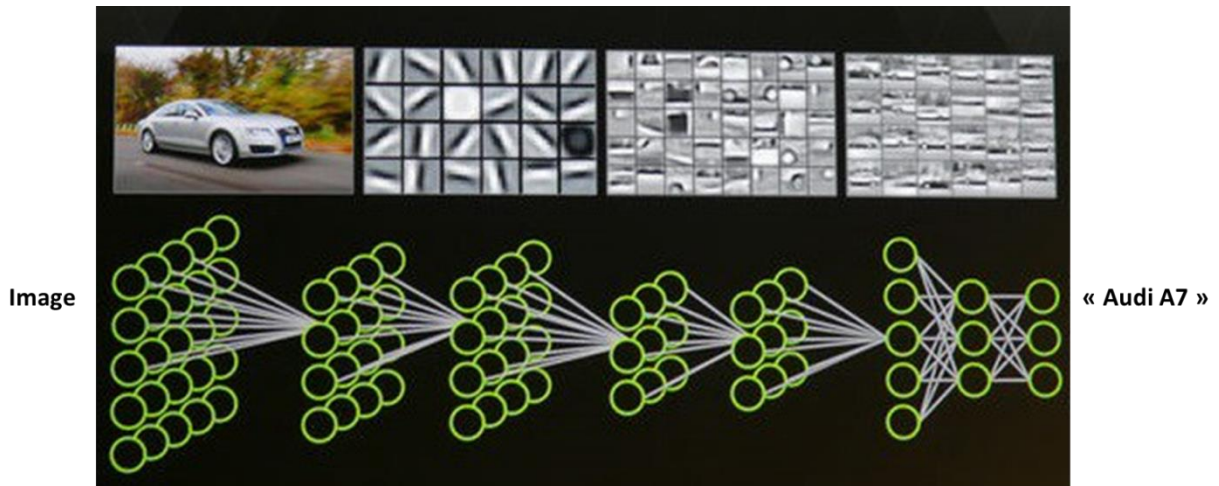
a. Généralités

Dans le très récent rapport de synthèse « France, Intelligence Artificielle » ("Rapport_synthese_France_IA), l'IA « regroupe un ensemble de notions s'inspirant de la cognition humaine ou du cerveau biologique, et destinées à assister ou suppléer l'individu dans le traitement des informations massives ». L'objectif de cette nouvelle science est de simplifier le travail humain essentiellement en ce qui concerne des tâches ciblées et répétitives, grâce à des machines. Développée au milieu du 20^{ème} siècle, des progrès considérables ont eu lieu au cours de ces dernières années et la réalisation de programmes informatiques conduit à surpasser l'Homme dans certaines de ses capacités cognitives emblématiques comme le jeu d'échecs en 1997 ou le jeu de go en 2016. Aujourd'hui de multiples champs d'applications de l'IA sont possibles dans des domaines très variés tels que la finance, l'armée, le droit, la logistique ou la médecine, et ce grâce aux diverses technologies d'IA développées. Parmi celles-ci, l'apprentissage automatique, ou « machine learning » est principalement utilisée pour la reconnaissance d'images.

b. Principes du “machine learning” et du “deep learning”

Le « machine learning » est basée sur des algorithmes capables d'accumuler des connaissances et de l'intelligence à partir d'expériences. Comme le cerveau humain, les algorithmes du « machine learning » apprennent par entraînement. Ils reçoivent d'abord des exemples, dont les résultats sont connus, font des prévisions, notent la différence entre les prévisions et les résultats, puis applique des pondérations pour affiner la précision des prédictions jusqu'à ce qu'elles soient optimisées. Ainsi, la qualité de ces prédictions s'améliore avec l'expérience.

Parmi les types d'algorithmes possibles, l'apprentissage en profondeur ou « deep learning », est la méthode que nous avons utilisée pour reconnaître et compter les follicules primordiaux dans les ovaires de souris. Cette technique repose sur le principe de neurones artificiels, connectés entre eux et qui ont un fonctionnement similaire à celui des neurones du cerveau humain. Ils forment un réseau comprenant de nombreuses couches de neurones, interagissant entre eux afin de délivrer une information la plus fiable possible. Plus le nombre de neurones est élevé, plus le réseau est profond. Plus spécifiquement, nous avons élaboré un algorithme de « deep learning » à partir d'un réseau de neurones à convolution (CNN). Ces réseaux ne s'inspirent pas seulement du fonctionnement du cerveau humain, mais aussi du système visuel. L'architecture d'un tel réseau est basée sur un empilement de couches de neurones connectés, chaque couche ayant un rôle bien spécifique. Les couches de convolution détectent les caractéristiques de l'image initiale, les couches de « pooling » synthétisent l'information et la couche finale (couche dense) met en commun toutes les informations reçues par les différents neurones afin d'identifier des éléments très spécifiques (Lee *et al.*, 2011). Un traitement correcteur peut être appliqué entre chaque couche pour améliorer la pertinence du résultat (Figure 22).



Lee et al, 2011

Figure 22. Exemple de reconnaissance d'image grâce à un réseau de neurones à convolution. Un réseau de neurones à convolution permet de reconnaître des images grâce à de multiples unités fonctionnelles, ressemblant à des neurones, reliées entre elles et ayant chacune une fonction bien définie afin d'analyser, au mieux, une image de départ et de donner une réponse sur la nature de cette image.

Dans cet exemple, chaque rond représente un neurone qui reçoit une information et la transmet aux neurones avec lesquels il est connecté. Ces neurones sont organisés en couche qui reçoivent une information sur l'image initiale par l'intermédiaire des couches précédentes : les premiers neurones voient l'image en entier mais les seconds ne sont au courant de l'image que par l'intermédiaire de l'information reçue par les premiers et ainsi de suite. Chaque couche a une fonction bien définie : la 1^{ère} couche est capable de détecter une notion de bordure ou de contour ; la 2^{ème} catégorie est capable de créer une notion de formes et ainsi de suite jusqu'à la couche la plus élevée qui est capable de reconnaître de véritables voitures jusqu'à prédire et classifier le type de voiture sur l'image. Si la première image de voiture n'est en réalité qu'une association de pixels, au fur et à mesure, ce système de couches de neurones est capable de comprendre de quelle voiture il s'agit exactement.

Le développement de ce type de réseau de neurones adapté à la détection et au comptage des follicules primordiaux dans les coupes d'ovaires de souris est rapporté dans l'Article 2.

B. Article 2

High-throughput ovarian follicle counting by an innovative deep learning approach

Charlotte Sonigo¹, Stéphane Jankowski², Olivier Yoo², Olivier Trassard³, Nicolas Bousquet^{2,4,5},

Michael Grynberg^{6,7}, Isabelle Beau¹ and Nadine Binart¹

Soumis à Scientific Reports (en révision)

High-throughput ovarian follicle counting by an innovative deep learning approach

Charlotte Sonigo¹, Stéphane Jankowski², Olivier Yoo², Olivier Trassard³, Nicolas Bousquet^{2,4,5}, Michael Grynberg^{6,7}, Isabelle Beau¹ and Nadine Binart¹

¹ Inserm U1185, Univ Paris Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, 94276, France

² Quantmetry, 128 rue du Faubourg Saint Honoré, 75008 Paris, France

³ INSERM, Institut Biomédical de Bicêtre, 80 rue du Général Leclerc, Le Kremlin Bicêtre, 94276, France

⁴ Sorbonne Université, Laboratoire de Probabilité, Statistique et Modélisation, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

⁵ Institut de Mathématiques de Toulouse, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31400 Toulouse, France

⁶ Service de Médecine de la Reproduction et Préservation de la Fertilité, Hôpital Antoine Béchère, 92140 Clamart, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, 94276, France

⁷ Univ Paris Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, 94276, France

Correspondence should be addressed to C. S. (email: charlotte.sonigo@gmail.com)

Abstract

The evaluation of the number of mouse ovarian primordial follicles (PMF) can provide important information about ovarian function, regulation of folliculogenesis or the impact of chemotherapy on fertility. This counting, usually performed by specialized operators, is a tedious, time-consuming but indispensable procedure. The development and increasing use of deep machine learning algorithms promise to speed up and improve this process. Here, we present a new methodology of automatically detecting and counting PMF, using convolutional neural networks driven by labelled datasets and a sliding window algorithm to select test data. Trained from a database of 9 millions of images extracted from mouse ovaries, and tested over two ovaries (3 millions of images to classify and 2 000 follicles to detect), the algorithm processes the digitized histological slides of a completed ovary in less than one minute, dividing the usual processing time by a factor of about 30, and it outperforms the measurements made by a pathologist in terms of optical detection. Its ability to correct label errors makes it accurate for conducting an active learning process with the operator, improving the overall counting iteratively. These results could be suitable to adapt the methodology to the human ovarian follicles by transfer learning.

Keywords : primordial follicle, deep learning, follicle count, ovaries

Introduction

The ovary is endowed with a number of follicles established early in life. At any particular chronological age, the vast majority of oocytes in the ovary are present within non-growing primordial follicles (PMF). Reproductive aging is a continuous process involving the depletion that begins prior to birth and extends through the menopausal transition¹. Actually, the fate of PMF may be triple: remaining quiescent for decades throughout the reproductive period; be activated and enter the growing process; or undergo atresia directly from the dormant stage².

Each PMF is constituted by an oocyte arrested in meiotic prophase surrounded by a single layer of flat somatic cells, called granulosa cells. The process of follicle maturation is controlled by many growth factors and characterized by the combination of oocyte growth, proliferation of granulosa cells and formation of a fluid cavity, the antrum. From puberty, follicle can reach pre-ovulatory status and ovulates. In whole ovaries, follicles coexist at different development stages.

The activation or initial recruitment of PMF starts during fetal (in humans) or neonatal (in rodents) period and continues along reproductive life until the exhaustion of the follicular pool³. Despite recent advances, the precise mechanisms at play in the follicular activation remain ill-established. A balance between inhibitory and stimulatory factors may be crucial for maintaining the female reproductive lifespan³. Any disorder in the regulation process, due to genetic anomalies or gonadotoxic treatment for example, can lead to a premature loss of the follicular stockpile. The precise estimation of the remaining pool of non growing follicles represents a major issue. Indeed, such a tool could be important for forecasting the reproductive lifespan and predicting future fertility. Furthermore, accurate models of reproductive aging would be relevant for women with a personal history of exposure to radiation, chemotherapy or prior ovarian surgery.

Yet, the actual number of PMF within ovaries can be assessed only using histological counting. However, classical PMF counting is a very complex, tedious, time consuming and operator dependent procedure⁴. Indeed, ovaries are serially sectioned and stained usually with hematoxylin-eosin. Then, a part of sections is manually analyzed by light microscopy for the presence of PMF. In order to improve this tedious procedure, corrective factors or evaluation of follicular density have been proposed. The complexity of the procedure may explain the huge variations, up to 10 fold, in PMF count reported in the literature^{4,5}.

The recent introduction of high-resolution digital slide scanner system that acquires whole-slide digital images offers the opportunity to quantify and improve histopathologic procedure with modern artificial intelligence methods⁶. Among these innovative technologies, deep learning is an actively emerging field regarding histological image analysis^{7,8}. Deep learning techniques and more particularly Convolution Neural Networks (CNN) are state of the art techniques for image classification and pattern detection⁹. They are largely used nowadays for face recognition, image tagging, or even breast cancer diagnosis¹⁰. The increasing number of studies reporting deep learning based on image analysis demonstrates the growing interest of the pathologist community for this innovative technology. This method can accurately localize and classify cells into different cell types¹¹⁻¹³.

The present study explores, for the first time, deep learning approach for detecting and counting PMF in mouse ovaries. The objectives of this study were: (i) to develop and test a CNN-based methodology to automatically recognize and count PMF within mouse ovaries; (ii) to evaluate the performance of this procedure compared with a classical observer recognition and counting.

Methods

Animals. Swiss adult female mice were purchased by Janvier, France. Mice were group-housed under controlled conditions of temperature ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), and lighting (12h light and 12h dark cycles with lights-on at 0700h), ad libitum access to food and water. Six-week-old animals were sacrificed by cervical dislocation and both ovaries were carefully removed. All procedures were approved by the local ethic committee Consortium des Animaleries Paris Sud (CAPSud) (N°2012–021).

Tissue collection and processing. Ovaries were fixed in Bouin's solution then embedded in paraffin blocks. Whole ovaries were serially cut into $4\ \mu\text{m}$ sections using a microtome. One out of five sections was mounted on microscope slides and stained with Hematoxylin Eosin. Each slide contained around 7-8 ovarian sections.

Manual follicle counting. The Panoramic 250 Flash, Slide Scanner (3DHISTECH Ltd. HUNGARY) system was used to capture digital whole slide high-resolution images ($0.122\ \mu\text{m}/\text{pixel}$) with a 40x Plan-Apochromat objective and a 1.6x camera adapter magnification. Each section was analyzed using Calopix Viewer[®], Follicles were classified according to Pedersen's classification¹⁴. Briefly, follicles were classified as primordial if they contained an oocyte surrounded by a partial or complete layer of squamous granulosa cells; as primary follicles if they contained an oocyte surrounded by a single layer of cuboidal granulosa cells; as secondary follicles if at least 2 layers of granulosa cells were presented and as antral follicles if an antrum cavity was visualized (Fig. 1). To prevent double counting, a follicle was counted only when the nucleolus was identified. Using Calopix Viewer[®], each follicle was annotated.

Data extraction and preprocessing for automated follicle count. Using the software Panoramic Viewer (3DHistech Ltd), the slides are extracted in a Tagged Image File Format (TIFF), suitable for analysis with usual deep learning tools. At the same time, the annotation coordinates from the manual follicle count were extracted with Calopix Viewer[®]. The result of this extraction is, for each slide, an Excel file containing every PMF, and its coordinates on the picture. This file is essential for the training of the supervised algorithm as it is used to automatically isolate the follicle images within the slide. Raw images extracted with the collection process presented above can approximate 200GB in size, limiting the analytical possibilities. To reduce the resolution, thus the size of the input files, two following approaches were applied: (i) Resolution reduction : A compromise on image quality can be done to obtain lighter images that still allow the model to give good performances; (ii) Color removal : each pixel of a colored image is a combination of 3 values for red, green and blue, when black & white, each pixel is represented by one unique value, considerably reducing the size of the initial image. In addition, color does not seem to be an important factor for follicle detection, as long as contrast is preserved.

These size reduction techniques can be applied when extracting the TIFF images from Panoramic Viewer. A LZW compression method was also used on the TIFF images to ease transfers and manipulations¹⁵.

Deep learning tools. Deep learning is a specific branch of machine learning and involves deep neural networks which are artificial neural networks (ANN) with more than one hidden layer¹⁶. An ANN is composed of interconnected units disposed in successive layers, described as neurons (Fig. 2). In their most simple forms, these structures can learn information and approximate on a priori unknown mappings between a set of observed inputs and labelled outputs. Given an input signal (x_1, \dots, x_n) , a neuron generates an output signal defined as

$$y = \sigma \left(\sum_{i=1}^n w_i x_i - b \right)$$

where σ is called the activation function, bringing non linearity to the equation, w_i is the weight and b the bias. Many functions can be used as activation functions, among them the sigmoid function and the Rectified Linear Unit (ReLU) function, which is mostly used for deep architectures since it avoids the so-called vanishing gradient problem threatening the consistency of weight estimation by backpropagation (see below)¹⁷. Every layer of is composed of numerous neurons as described above.

More precisely, CNN were implemented, a type of feed-forward neural network known for its performance in computer vision tasks, as image analysis¹⁶. A CNN is usually composed of successive convolution and pooling layers, which act as features extractors, and generally ends with a fully-connected layer that aggregates this information. Each convolution layer can browse a fraction of an image and determine particular shapes by studying spatial dependencies between the different pixels of this fraction of the image, through the effects of a matrix of weights called a convolutional matrix or kernel. The output of a convolution layer is called a feature map. To reduce the dimension of a feature maps, pooling layers are usually used after convolutions. The classifier trained in this application is a custom implementation of a CNN mainly inspired by the VGG 19 architecture¹⁸, and the fully-connected layer that aggregates this information is produces the final output through the softmax activation function, defined in its j -th dimension by (for $j = 1, \dots, d$)

$$\sigma(z)_j = \frac{e^{z_j}}{\sum_{k=1}^d e^{z_k}},$$

that provides a estimator of the vector probability of PMF presence in the sliding window.

Technical details about the architecture of the CNN, the nature of convolutional kernels and the pooling procedure are provided within the Supplementary Information (See Supplementary Fig. S1-S2-S3 and Supplementary Methods). The choice of this CNN laid on

a preliminary study, where the classification power of two kinds of CNN (VGG versus the popular Alexnet architecture¹⁹) were compared over 1356 follicle images, with slightly better results for the VGG. Note besides that Region Based CNN²⁰ and other Selective Search-based algorithms, as Faster RCNN²¹, which aim to locate an object within an image and to contour the neighboring area faster than using an iterative sliding window technique, could not be used here because they mostly require the complete image as an input; this problem could not be addressed our large medical images.

Optimisation procedure. The optimisation of the CNN stands on the optimal assessment of weight (or convolutional) matrices from the training sample. The concept of backpropagation is key in this assessment and use of a neural network. During an iterative training phase, it is what makes the model more accurate every iteration. It uses the error made by the model at a given iteration to adjust the weights of the network. This progressive updating of weights to converge toward a more accurate model is represented by an optimization procedure. Different optimization techniques can be used to train a neural nets, mainly based on the stochastic gradient descent procedure.

For the optimization of our neural network a strategy of batch gradient descent was chosen, as it is a good trade-off between the traditional Stochastic Gradient Descent (SGD) and the batch gradient descent. Besides, the Adadelta optimization procedure was chosen²². Adadelta improves the gradient descent algorithm with the implementation of *momentum* and an adaptative learning rate. Moreover it does not require to initialize a learning rate, which makes it really convenient to use. To prevent overfitting in the assessment of the weights of the neural network, a dropout procedure was used²³. Technical details about this procedure are provided within the Supplementary Fig. S4.

Hardware and software specifications. All the code was created in Python 3. The following modules were used for specific treatments: (i) Keras to build the CNN²⁴: It is a high-level module that runs on top of Tensorflow²⁵, the deep learning library developed by Google Brain. (ii) OpenCV to manipulate images during the preprocessing phase²⁶. It implements the contour detection algorithm and other specific functions for image manipulation. The code created for this project respects the best practices of Domain Driven Design²⁷, aiming for a clear and well-structured code. The computer used to manipulate the images and to compute the CNN had a NVIDIA GeForce GTX 970 Graphical Processing Unit (GPU) with 1664 CUDA cores and 128GB of RAM. The GPU allows better computing time for image processing and analysis. It is to be noted that more recent GPU could easily improve the computing performances of the project. The software specifications for this work allow the code to be easily reran on another computer or server since it only uses open source tools, developed for multiple operating systems. It does not depend on a specific hardware but the use of a last generation GPU and 128GB of RAM is advised for good performances and reasonable execution time.

Evaluation design and protocol. Two metrics were chosen to evaluate the performances of the model. The first one is the recall, representing the percentage of follicles actually found with the algorithm. This number is expected to be as close as one as possible, meaning the algorithm does not miss any follicle. Note that considering the use of non maximum suppression, a frame containing two actual follicles will count as two found follicles (and not one true positive, as in precision). However, this recall metric needs to be balanced with a precision metric that takes into account the false positives of the model. Indeed a perfect recall can be obtained by predicting everything as a follicle, though not representing a good model. Precision is defined as the number of true positives (TP) divided by the sum of true

positives and false positives (FP). TP is the number of frames predicted as follicles that actually contain a follicle and FP is the number of frames wrongly predicted as follicles. A precision close to 1 means that the algorithm tends to be right when it make a follicle prediction. Balancing the two metrics allow one to evaluate properly the overall quality of a model.

Results

Manual follicle counting. Twenty-four mouse ovaries were evaluated in this pilot study. All ovaries were serially cut and one out five sections was mounted on microscope slides. One slide contained an average of 7-8 ovarian sections. A total of 194 slides were captured with the Slide Scanner and 1454 ovarian sections were analyzed by a single observer using Calopix Viewer[®]. All type of visualized follicles were classified according to Pedersen classification¹⁴ (Fig. 1) and specifically annotated using Calopix Viewer annotation system. Click annotation extraction in Excel format allows to count every follicles. A total of 40488 follicles were manually counted. Among them 21335 PMF were identified. Thus, each ovary contained an average of 888.9 ± 277.6 PMF. The time estimated for PMF counting was approximately one hour for one slide namely about 7-8 hours for one ovary.

Data extraction. Sixty-four slides containing 7-8 ovarian sections were extracted in TIFF image as represented in Fig. 3a. Therefore, the first step aimed to isolate every section into its own image in order to remove all the noise represented by the empty white spaces between the histological sections. For this purpose, the algorithm developed by Suzuki & Keiichi was used²⁸. We applied the contour detection algorithm to a low resolution version of the slide in order to get better performance by preventing details and specificities of the sections to add noise to the detection process. The results of the detection were checked, both visually and by

making sure no actual follicle was cropped out with this technique. An example of the application of this algorithm is reported on Fig. 3b. Finally, using the click coordinates from the manual counting, small frames containing the PMF can be extracted. They will represent the positive examples in the supervised methodology described below. The size of the frame is constant for all PMF and empirically calculated to make sure it always contains the PMF. Many negative examples, with the same frame size, were randomly picked in the cut images to balance the dataset.

A last phase of data augmentation was conducted to increase the relevance of the dataset for feeding a detection and classification algorithm. It stands on the fact that some image distortions produces other relevant images for the study (namely, images that could have been observed too)²⁹. In our context only the following geometrical distortions were applied to increase the dataset: rotations, image translation and horizontal and vertical image reversals.

Developing and training a deep learning approach. In the present study, 48 slides corresponding to 6 whole ovaries were used to develop and train the algorithm process. Follicle detection was defined as a two-stages process. First, a CNN was trained to classify whether an image contains a follicle or not, as illustrated in Fig. 4a. The training dataset contains small frames of both real follicles and random parts of the ovary section. Secondly, a sliding window was used to analyze the image and, for each image extracted by this way, predicted the presence of a follicle using the model previously trained. The window was the same size as the frames previously used to train the CNN (Fig. 4b). Note that, in the prediction process, successive windows overlap by half to make sure that no follicle is missed due to position in the window (for example section between two windows or in an edge of the window). However this overlap can generate multiple positive frames for the same follicle. This could lead to an overestimation of the performance metrics with artificial true positive examples. To

avoid this problem, a non maximum suppression technique³⁰ was implemented. It aims to keep only the frame giving the maximum probability of follicle within multiple adjacent positive frames, thus avoiding the redundancy problem (see Fig. 4c for an illustration).

Reliable follicle counts with the automated procedure. Two whole ovaries were used as a testing set, resulting in 2 875 160 images from the 15 slides available. A total of 1667 PMF were manually counted and annotated. The training time to process one ovary is around 1 hour, with small variations depending on the number of slides and sections per slide (typically 1 slide is processed in 7 minutes on average). Note that every True Positives (TP) and False Positives (FP) found during the prediction was saved as well as a more global cut image with squares surrounding the found follicles. This saving aspect had a significant contribution to the overall prediction time of the algorithm.

The model outputted, for one frame, a probability of containing a PMF. A threshold must be set to discriminate between positives and negatives. Intuitively, variations of this threshold will influence the number of TP and FP and so recall and precision.

Remind that recall, or sensitivity, is defined in the present context by

$$recall = \frac{\textit{number of correctly detected follicles}}{\textit{number of real follicles}},$$

while the precision is defined by

$$precision = \frac{\textit{number of correctly detected follicles}}{\textit{number of detected follicles}}.$$

For this study, a relatively low threshold was chosen in order to keep a high recall, thus finding nearly all the actual PMF, but at the cost of many FP. A recall of 99.46% was found with a precision of 11.32%. This means that 1658 out of 1667 follicles were found whereas

only one out of ten positive prediction from the CNN was a right one (nearly 89% of detected follicles were FP).

A hard negative mining (HNM) methodology³¹ was implemented in order to reduce the huge number of false positive. It consists in, after a first phase of training, adding false positive from a specific HNM dataset forced as negative examples in the training set and continuing with training. The negative examples of the training set are resampled to avoid training on unbalanced data. HNM encourages the model to focus on examples that still trick the model after a first step of training and so to avoid FP in the future. This procedure considerably improves the precision metric. However, it also has a negative impact on the recall and needs to be used carefully. After the HNM implementation, precision was 57.38% for a recall of 90.40% (nearly 43% of detected follicles were FP). Finally, note that some of the FP remaining in the final prediction of the algorithm are actual follicles missed during the fastidious manual counting. After a manual check on the FP generated by the model, 185 turned out to be missed follicles, that being 19,5% of all the FP. Considering this, the final results were corrected, giving a recall of 91,36% with a precision of 65,69%. All the results at the different steps of the evaluation process can be viewed in Table 1.

Discussion

The development of whole slide scanning system that digitizes slides with stained tissue sections at high resolution allowed to improve histological analysis. Moreover, this system acquiring whole-slide digital images offers the application of innovative image analysis techniques for the histopathological examination. Among these techniques, deep learning is a modern artificial intelligence method which emerged in the field of histopathology over the past few years. This CNN allows automated quantification of various

parameters on slides^{8,11,32}. In the present study, we applied for the first time these two techniques to evaluate the follicular content and especially the PMF count in mouse ovaries. We showed that deep learning approach allowed PMF recognition and subsequently counting within serially ovarian sections.

Classically, slides are analyzed with microscope and follicle count is generated manually on multiregistered cell counter³³. Therefore, data are recovered and then transferred to a computer database. This technique is laborious, costly, time consuming and hardly operator-dependent. Thus, over the past decades efforts were made to improve this procedure and different ovarian follicle counting protocols had been investigated. First, authors proposed to count follicles not in all sections but only in every fifth to tenth sections. For example, a study compared the efficiencies of various sampling paradigms to define sensitive and less tedious means to obtain differential follicle counts and concluded that follicle counts from 1% to 5% random samples may provide a good estimation of ovarian toxicity in mice³³. Accepting that this sampling procedure supplies a reliable estimate of follicles number per ovary, researchers proposed to apply a corrective factor to account for the proportion of the ovary not included in the sampling analysis. This corrective factor varies in literature from 5 to 80, everytime with “rational” explanation⁴. Thus, the number of follicles varies by 10-fold or more depending on the study and this technique was not reproducible. Therefore, other methods, as the use of fractionator/physical dissector technique have been evaluated to determine the number of follicles in mice⁵, non-human primate³⁴ or human ovaries³⁵. This technique based on stereology techniques avoids the introduction of corrective factors and seems more efficient and less time-consuming³⁵. Nevertheless, this technique needs the use of an oil immersion objective on microscope and the follicle counting still remains manual and operator dependent.

In the present study, we proposed, for the first time, an automatized technique for PMF counting using deep learning approach. This method is efficient and accurate to appreciate the PMF number. Moreover, it outperforms manual procedure since it is time saving and allows the detection of some forgotten PMFs by the operator. In addition, this algorithm makes it possible to highlight any errors in the operator's classification. The latter can then act in turn as an oracle, checking certain false positive predictions. This iterative process of active learning between the algorithm and the operator allows for an increasing reliability of counting and learning.

Several avenues of research, which will be the subject of future work, are likely to further increase the operational scope of this study. First, the implementation of the exploration and classification algorithm currently requires the conversion of images originally created in MRXS to TIFF. This operation is currently very expensive in terms of computation time but will benefit from the forthcoming arrival of new technological improvements.

Above all, the binary classification operated by the algorithm could be extended. Indeed, for this pilot study, we choose to count only PMFs as these follicles represent the ovarian reserve and are the most abundant follicular population. Furthermore they are difficult to detect in ovarian cortex. Nevertheless, counting all follicles within ovaries and differentiating each follicle type is an important issue for fertility studies. Thus, the count of all follicular classes is needful and a new procedure should be developed. This could be carried out by using a softmax activation function. On the one hand, it would require more and finer labelled data, but also a slight increase in the number of convolution and pooling layers. The latter would make it possible to differentiate follicles according to a greater number of patterns hidden in the images. The reduction of processing time mentioned above is therefore an important factor for the success of this approach.

Finally, the development of an accurate method to count PMF into human ovaries represents a great challenge to investigate aging process for example. The implementation of this whole methodology for counting human ovarian follicles could feed on the close proximity between human follicles and mouse follicles. If human follicles are larger than mouse follicles, their morphology remains similar. It would therefore seem appropriate to use a CNN calibrated on mouse data to pre-train a CNN dedicated to human data processing (transfer learning process), treating hyperparameters related to size and shape of objects differently. A particularly domain of interest for human might be PMFs count in cortex ovaries from patients facing with cancer. Indeed, girls or young women, frequently received chemotherapeutic agents which are potentially toxic for ovaries leading to the depletion of follicular stockpile and subsequent infertility³⁶. As advances in cancer treatment have greatly improve survival rate, the question of fertility after healing become more and more important and the maintenance of future fertility is now considered of great importance³⁷. Thus, several fertility preservation had been developed. Among them, ovarian tissue cryopreservation is an effective technique which can be proposed for both prepubertal girls and women in reproductive age, allowing the restoration of natural pregnancy ovarian function and possible natural pregnancies³⁸. The precise evaluation of the number of PMF within these ovaries might allow to better inform patient and to improve this effectiveness of the technique.

References

1. Wallace, W. H. B. & Kelsey, T. W. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PloS One* **5**, e8772 (2010).
2. Reddy, P., Zheng, W. & Liu, K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **21**, 96–103 (2010).
3. Monniaux, D. *et al.* The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? *Biol. Reprod.* **90**, 85 (2014).
4. Tilly, J. L. Ovarian follicle counts--not as simple as 1, 2, 3. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* **1**, 11 (2003).
5. Myers, M., Britt, K. L., Wreford, N. G. M., Ebling, F. J. P. & Kerr, J. B. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reprod. Camb. Engl.* **127**, 569–580 (2004).
6. Casari, C. *et al.* Accelerated uptake of VWF/platelet complexes in macrophages contributes to VWD type 2B-associated thrombocytopenia. *Blood* **122**, 2893–2902 (2013).
7. Sharma, H., Zerbe, N., Klempert, I., Hellwich, O. & Hufnagl, P. Deep convolutional neural networks for automatic classification of gastric carcinoma using whole slide images in digital histopathology. *Comput. Med. Imaging Graph. Off. J. Comput. Med. Imaging Soc.* (2017). doi:10.1016/j.compmedimag.2017.06.001
8. Vandenberghe, M. E. *et al.* Relevance of deep learning to facilitate the diagnosis of HER2 status in breast cancer. *Sci. Rep.* **7**, 45938 (2017).
9. LeCun, Y., Bengio, Y. & Hinton, G. Deep learning. *Nature* **521**, 436–444 (2015).
10. Araújo, T. *et al.* Classification of breast cancer histology images using Convolutional Neural Networks. *PloS One* **12**, e0177544 (2017).
11. Cireşan, D. C., Giusti, A., Gambardella, L. M. & Schmidhuber, J. Mitosis detection in breast cancer histology images with deep neural networks. *Med. Image Comput. Comput.-Assist. Interv. MICCAI Int. Conf. Med. Image Comput. Comput.-Assist. Interv.* **16**, 411–418 (2013).
12. Su, H. *et al.* Robust Cell Detection and Segmentation in Histopathological Images Using Sparse Reconstruction and Stacked Denoising Autoencoders. *Med. Image Comput. Comput.-*

- Assist. Interv. MICCAI Int. Conf. Med. Image Comput. Comput.-Assist. Interv.* **9351**, 383–390 (2015).
13. Sirinukunwattana, K. *et al.* Locality Sensitive Deep Learning for Detection and Classification of Nuclei in Routine Colon Cancer Histology Images. *IEEE Trans. Med. Imaging* **35**, 1196–1206 (2016).
 14. Pedersen, T. & Peters, H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.* **17**, 555–557 (1968).
 15. Welch, T. A. A Technique for High-Performance Data Compression. *Computer* **17**, 8–19 (1984).
 16. Goodfellow, I., Bengio, Y. & Courville, A. *Deep Learning (Adaptive Computation and Machine Learning series)*. (2016).
 17. Hochreiter, S., Bengio, Y., Frasconi, P. & Schmidhuber, J. *Gradient Flow in Recurrent Nets: the Difficulty of Learning Long-Term Dependencies*. (2001).
 18. Simonyan, K. & Zisserman, A. Very Deep Convolutional Networks for Large-Scale Image Recognition. *ArXiv14091556 Cs* (2014).
 19. Krizhevsky, A., Sutskever, I. & Hinton, G. E. ImageNet Classification with Deep Convolutional Neural Networks. in *Advances in Neural Information Processing Systems 25* (eds. Pereira, F., Burges, C. J. C., Bottou, L. & Weinberger, K. Q.) 1097–1105 (Curran Associates, Inc., 2012).
 20. Girshick, R., Donahue, J., Darrell, T. & Malik, J. Rich Feature Hierarchies for Accurate Object Detection and Semantic Segmentation. in *Proceedings of the 2014 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition* 580–587 (IEEE Computer Society, 2014). doi:10.1109/CVPR.2014.81
 21. Ren, S., He, K., Girshick, R. & Sun, J. Faster R-CNN: Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks. *ArXiv150601497 Cs* (2015).
 22. Zeiler, M. D. ADADELTA: An Adaptive Learning Rate Method. *ArXiv12125701 Cs* (2012).

23. Srivastava, N., Hinton, G., Krizhevsky, A., Sutskever, I. & Salakhutdinov, R. Dropout: A Simple Way to Prevent Neural Networks from Overfitting. *J. Mach. Learn. Res.* **15**, 1929–1958 (2014).
24. Chollet, F. Keras. (2015).
25. Abadi, M. *et al.* TensorFlow: Large-Scale Machine Learning on Heterogeneous Distributed Systems. *ArXiv160304467 Cs* (2016).
26. Bradski, G. The OpenCV Library. *Dr. Dobb's* Available at: <http://www.drdobbs.com/open-source/the-opencv-library/184404319>. (Accessed: 16th February 2018)
27. Evans, E. *Domain-Driven Design: Tackling Complexity in the Heart of Software*. (2013).
28. Suzuki, S. & be, K. Topological structural analysis of digitized binary images by border following. *Comput. Vis. Graph. Image Process.* **30**, 32–46 (1985).
29. Perez, L. & Wang, J. The Effectiveness of Data Augmentation in Image Classification using Deep Learning. *ArXiv171204621 Cs* (2017).
30. Felzenszwalb, P. F., Girshick, R. B., McAllester, D. & Ramanan, D. Object Detection with Discriminatively Trained Part-Based Models. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **32**, 1627–1645 (2010).
31. Dalal, N. & Triggs, B. Histograms of oriented gradients for human detection. in *2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05)* **1**, 886–893 vol. 1 (2005).
32. Wang, H. *et al.* Mitosis detection in breast cancer pathology images by combining handcrafted and convolutional neural network features. *J. Med. Imaging Bellingham Wash* **1**, 034003 (2014).
33. Bucci, T. J., Bolon, B., Warbritton, A. R., Chen, J. J. & Heindel, J. J. Influence of sampling on the reproducibility of ovarian follicle counts in mouse toxicity studies. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **11**, 689–696 (1997).

34. Miller, P. B., Charleston, J. S., Battaglia, D. E., Klein, N. A. & Soules, M. R. An accurate, simple method for unbiased determination of primordial follicle number in the primate ovary. *Biol. Reprod.* **56**, 909–915 (1997).
35. Charleston, J. S. *et al.* Estimating human ovarian non-growing follicle number: the application of modern stereology techniques to an old problem. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **22**, 2103–2110 (2007).
36. Guzy, L. & Demeestere, I. Assessment of ovarian reserve and fertility preservation strategies in children treated for cancer. *Minerva Ginecol.* (2016).
37. Assi, J. *et al.* Psychosocial benefits of fertility preservation for young cancer patients. *J. Assist. Reprod. Genet.* (2018). doi:10.1007/s10815-018-1131-7
38. Donnez, J. & Dolmans, M.-M. Fertility Preservation in Women. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1657–1665 (2017).

Acknowledgements.

We thank N.Ba for performing tissue sections (Institut Biomedical de Bicêtre, University Paris Sud). For Charlotte Sonigo, funding was from Plan Cancer 2014-2019 / INSERM.

Author contributions

SJ, NBi, OT, OY and CS designed the study; OT performed the capture of digital whole slide high-resolution images; CS performed the manual follicle counting; OY and SJ developed and performed image analysis; CS, SJ, NBo, NBi, IB and CS wrote the manuscript; MG critically reviewed the manuscript. All authors approved the manuscript.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper

Competing financial interest statements. The authors declare no competing financial interest

Figures Legends

Figure 1. Identification of follicle type . (a) Example of one ovarian section stained with hematoxylin-eosin containing different classes of follicles. (b) Examples of a primordial follicle pointed by black arrow (left), constituted by an oocyte surrounding by some flattened granulosa cells; 2 primary follicles (right) constituted by an oocyte surrounded by a single layer of cuboidal granulosa cells. Below, a secondary follicle (left) with one oocyte surrounded by several layers of granulosa cells and an antral follicle (right) with a liquid cavity. Scale bars are shown.

Figure 2. Illustration of an artificial neural network (ANN). A ANN is defined by successive layers, bias and activation functions, transforming a multivariate signal into a (possibly) multivariate output. σ is the activation function, bringing non linearity to the equation, w_i is the weight and b the bias

Figure 3. Scan of a slide containing ovarian sections. (a) Example of a raw slide containing 8 H&E stained sections from an ovary. (b) All sections are transformed individually as black and white images and isolated to remove the empty spaces.

Figure 4. Deep learning training steps. (a) First step is a training of follicle detection. (b) In the second step, sliding windows (grey, white and black squares) scan the cut image and use the previous step to detect or not detect follicles. (c) Illustration of overlapping and application of the non maximum suppression technique. The windows (white dotted lines) with adjacent frames are computed in a probability vector (p_1, p_2, p_3) of PMF presence by the neural network, with $p_1 < p_2$ and $p_3 < p_2$. The imputation results of windows 1 and 3 are then removed from the detection process. This process aims to keep only the frame giving the maximum probability of follicle.

Table 1. Different steps of the evaluation process

	Phase I (after training)	Phase II (after training and HNM)	Phase III (after training, HNM and operator focus)
Total number of images	2 875 160	2 875 160	2 875 160
Number of false positive	14 053	949	949 - 185
% of false positive	0.49%	0.044%	0.037%
Number of true negative	2 859 304	2 872 421	2 872 421
% of true negative	99.45%	99.90%	99.90%
Precision (%)	11.32%	57.38%	65.69%
Recall (%)	99.46%	90.40%	91.36%
Number of detected follicles	1 658	1 507	1692 (1 507 + 185)

Data were based on 1667 manually counted follicles.

HNM: Hard Negative Mining

Figure 1

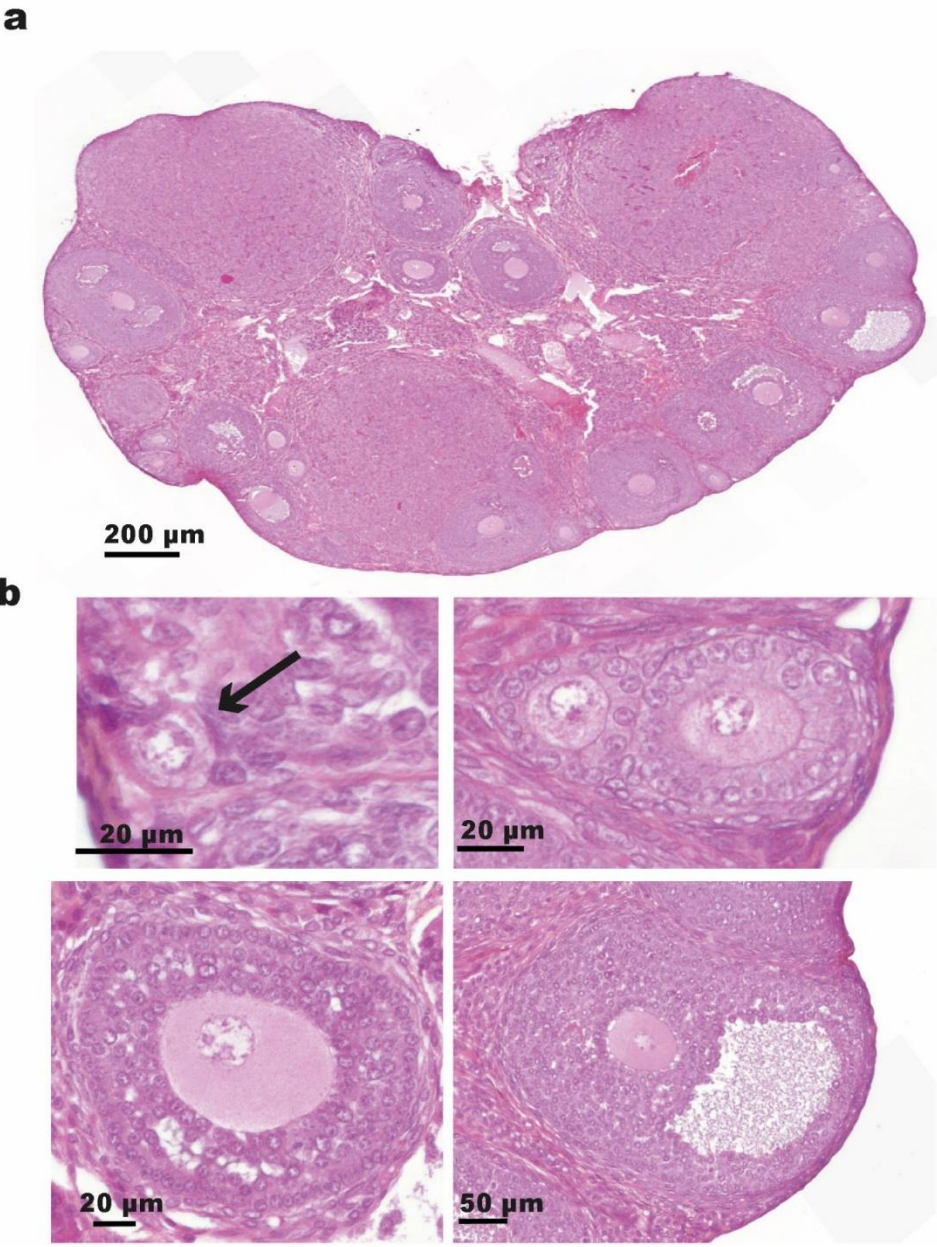


Figure 2

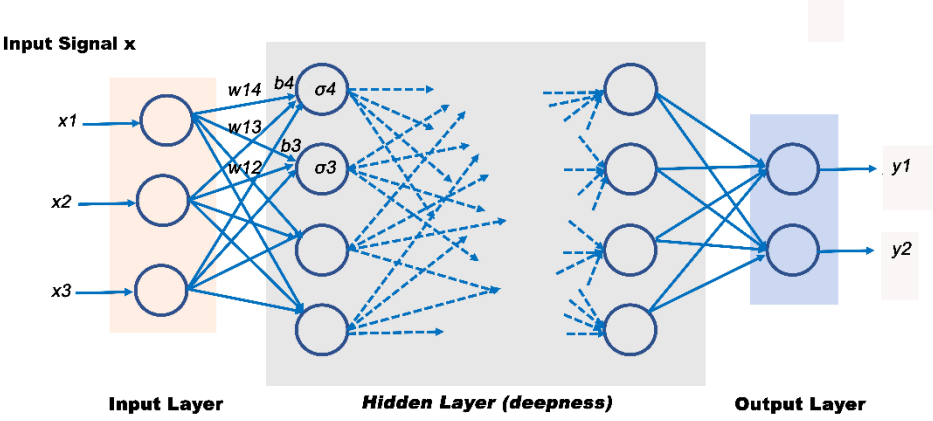


Figure 3

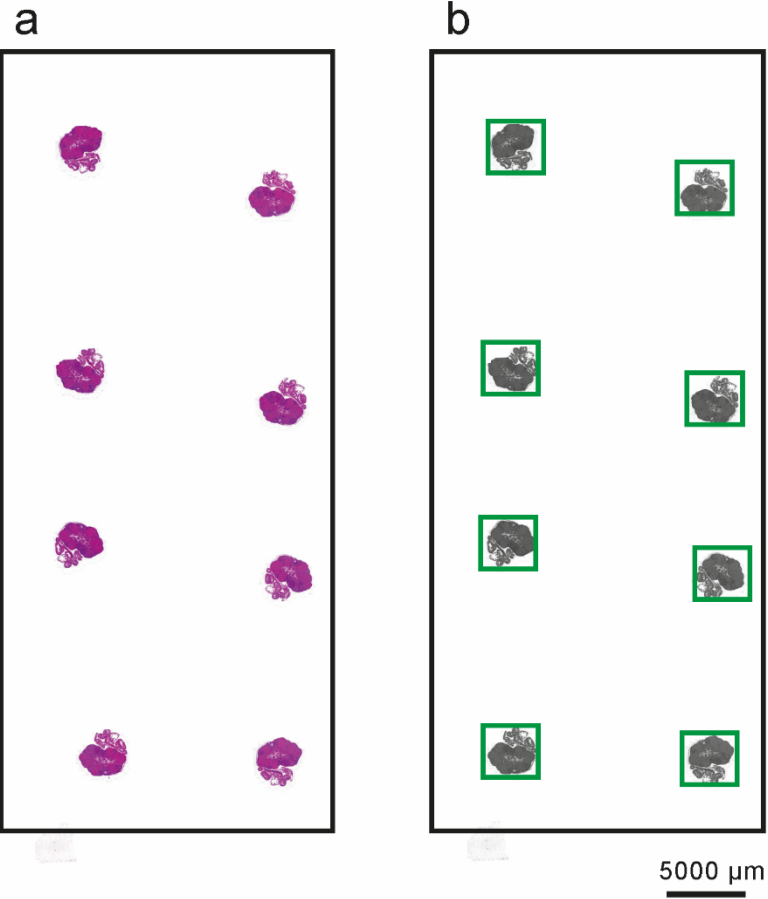
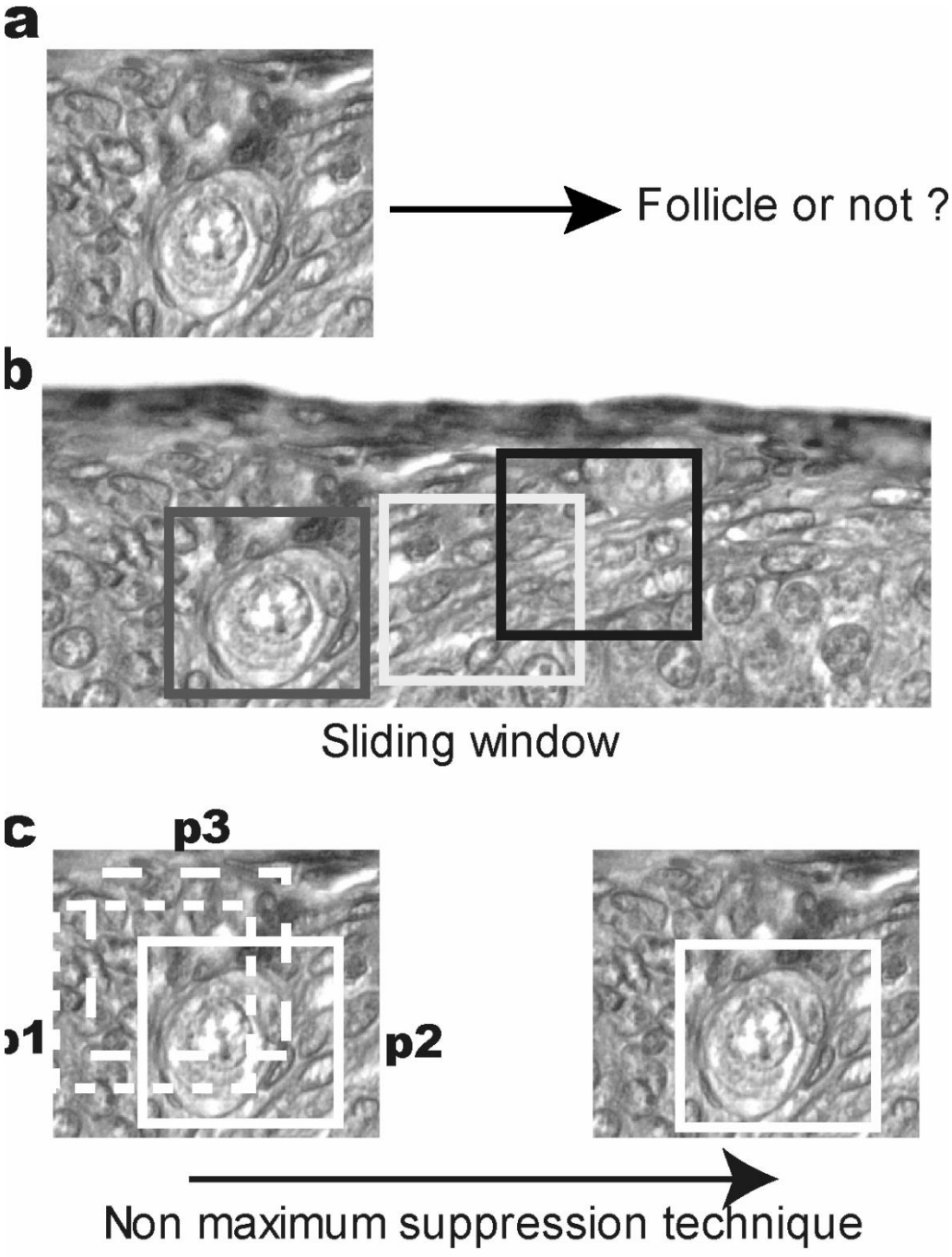
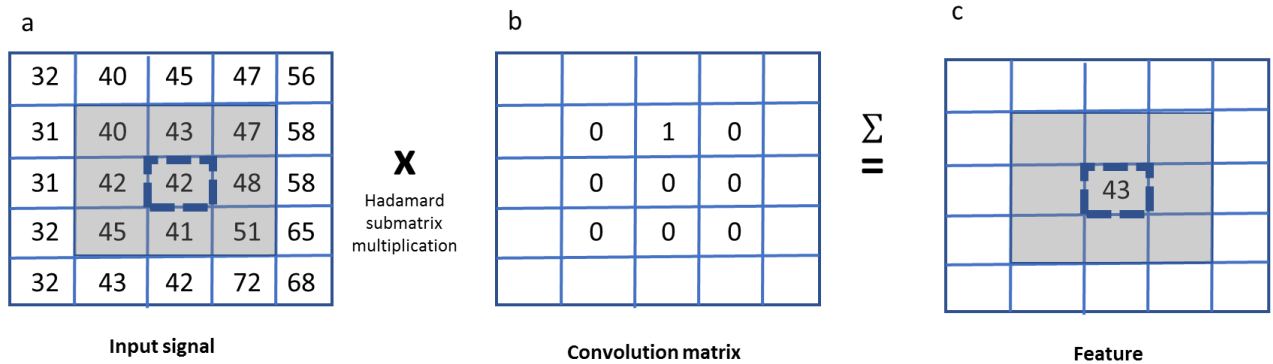


Figure 4



Supplementary Method. Max-pooling. Pooling layers are frequently used after convolution layers to reduce feature maps and avoid over-learning by synthesizing the information transmitted by these maps while significantly reducing the overall computational cost. Indeed they do not require any weight training. A pooling layer splits the image (or a fraction of an image in the case of CNN) into a series of non-overlapping rectangles of $n \times p$ pixels, each of them being affected a global value defined as the output of a function of the values of all pixels belonging to the rectangle. In this work, an usual choice of $n \times p = 2 \times 2$ rectangles procedure was made to minimize the loss of information by choosing the common max-pooling procedure (selecting the highest pixel value in the rectangle), known to provide robustness to local deviations of features and switching between activation subsets.

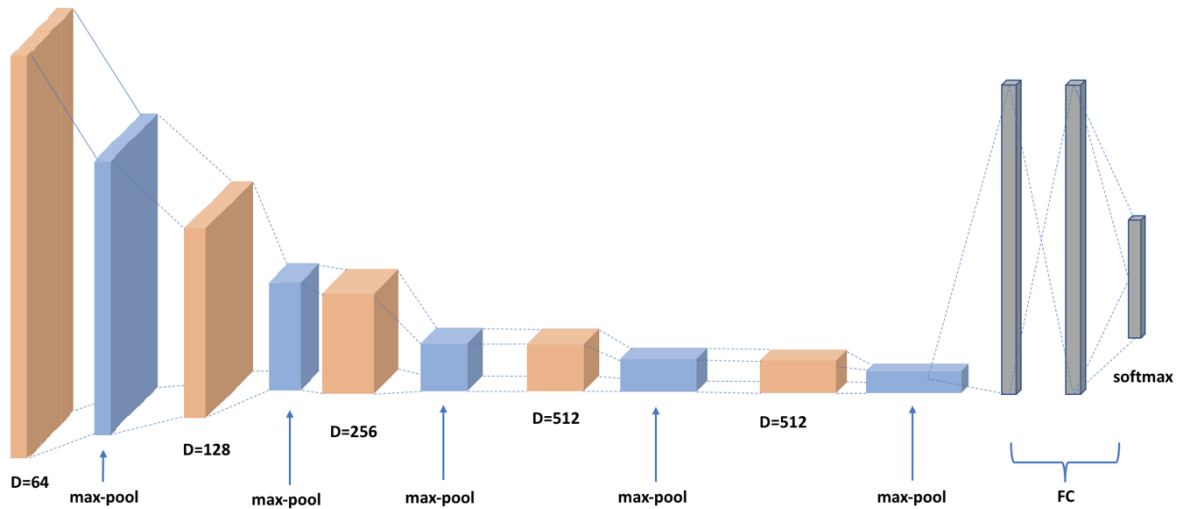


Supplemental Figure S1. Simple Convolutional kernels. In the discretized world of image processing, a convolutional kernel is a matrix of weights transforming a fraction of an input image, described as an array of pixels, into a feature of ordinarily smaller dimension (the ensemble of feature being called a *feature map*). The matrix of weights is designed in order to favor features exhibiting particular spatial dependencies between pixels, the complexity of which increasing with the depth of the convolutional layer. The left matrix (**a**) describes an image where a group of pixels (in grey) is selected. The convolutional network browses successively each pixel of the submatrix (called “initial” pixel) and multiply its value and the value of the 8 neighboring pixels by the corresponding value within the kernel (**b**), then add the results. In the example, the initial pixel in left is delimited by dashed lines. The graphical result of the submatrix multiplication is a one-pixel downward shift of the initial pixel (**c**).

	1	0	1	
	0	1	0	
	1	0	1	

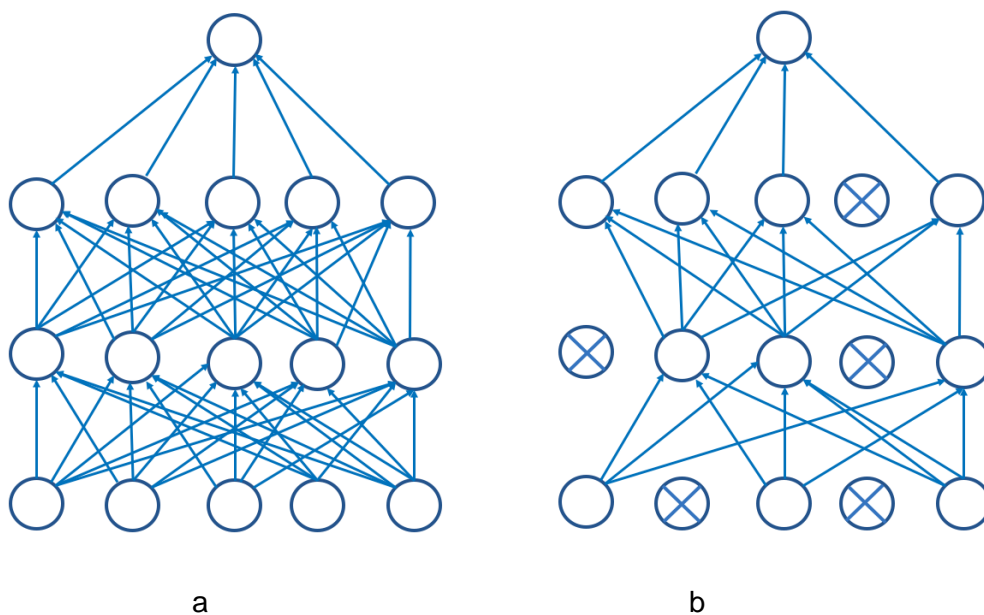
Supplemental Figure S2. A more elaborated convolution kernel. Here, the kernel is designed to detect cross-shaped patterns within the pixels. This type of more elaborated kernel, for instance, can be structured to detect cross-shaped patterns.

In the present work, as usually for neural network techniques, the kernels were automatically learned within the training phase, by comparing predicted and observed labels and using backpropagation. More generally, a CNN is determined by the dimensions (W,H) of the kernel (width and height of the convolution matrix), its depth D (the number of feature maps), its stride S (measuring the overlapping of kernels browsing the image ; the largest, the weakest overlapping) and the padding P, which mainly controls the dimension of images, maps and output. It can be used to generate artificial pixels around the input image (or fraction of image) such that the dimensions of the image and the feature map be similar.



Supplemental Figure S3. VGG convolutional neural networks. The VGG architecture is widely used because of its simplicity. It is composed only of convolutional layers using a kernel of dimensions $(W,H) = (3,3)$ and a stride $S=1$, and max-pooling layers with dimensions $n \times p = 2 \times 2$ with a stride $S=2$. It therefore belongs to the wider class of most used CNN. The rationale for this choice is that applying three consecutive convolutions to a fraction of image using a kernel of dimensions $(3,3)$ is tantamount to studying the same part of the image using a convolutional kernel of dimensions $(7,7)$. This avoids to use large convolution kernels to detect large shapes within the distribution of pixels. In addition, the successive use of three small convolutions allow to apply a greater number of activation functions and detect nonlinearities. A VGG-10 architecture was trained and used for this study, which instantiates 10 convolutional layers. This choice was made after preliminary testing, since it empirically optimizes a trade-off between the relative complexity of the detected objects (cells with kernels of a certain shape, in a strongly heterogeneous environment) and the time requirements for the study. The training requires typically less than two weeks on a four-GPU computer.

$D = \text{depth}$, $3 \times 3 = \text{convolutional kernel dimensions}$. The last two layers are « fully-connected » (FC) layers, where each neuron is connected to all neurons of the previous layer. These FC layers aggregate all pieces of information processed separately by browsing kernels, and provide the final result (probability vector) using a softmax activation function.



Supplemental Figure S4. Avoiding overfitting using dropout. The effect of dropping out neurons **(b)** on a standard neural network architecture **(a)**. The computational cost of training a convolutional neural network limits the practical relevance of classical machine learning techniques for preventing overfitting, as cross-validation, especially when considering several models. The so-called dropout method is considered as a powerful alternative. The principle of this regularization method is to turn off (“dropping out”) random neurons during network training. This method avoids the "co-adaptation" of neurons, namely the fact that a neuron can correct bad learning of a neuron from a previous layer. The dropout procedure is uniquely conducted during the training phase, and it is parameterized by the ratio R of randomly dropped neurons during the training, per convolutional layer. Empirical tests led us to make the usual choice $R = 0.5$.

C. Discussion et perspectives

Dans cette étude, en collaboration avec l'entreprise Quantmetry, nous avons développé une technique d'IA permettant d'accélérer et d'améliorer le processus de comptage des follicules primordiaux chez la souris, à partir de lames histologiques contenant des coupes d'ovaires scannées et numérisées. Un algorithme de deep learning, constitué de réseaux neuronaux à convolution pilotés par un sous-algorithme à fenêtres glissantes, a été élaboré. Il a été entraîné sur une base de données de 9 millions d'images extraites de 6 ovaires de souris. Dans un second temps, cet algorithme a été testé sur 2 ovaires, représentant près de 3 millions d'images qui ont été analysées. Parmi ces images, environ 2000 follicules primordiaux devaient être détectés. Ces follicules avaient été préalablement identifiés et annotés dans le cadre d'une analyse manuelle classique. Dans un premier temps, l'algorithme a été capable de compter quasiment tous les follicules préalablement annotés. Cependant cette excellente sensibilité, supérieure à 99%, était possible au prix d'une très mauvaise spécificité, l'algorithme comptabilisant des structures cellulaires ressemblant à des follicules primordiaux comme des sections de capillaires par exemple. Une méthode de « hard negative mining » a été mise en œuvre afin de remédier à ce problème. Brièvement, cette technique consiste à améliorer l'identification des faux positifs grâce à un entraînement plus poussé et spécifique de l'algorithme. Enfin, une dernière étape, utilisant mon œil « d'expert », a permis non seulement d'optimiser les résultats mais aussi de mettre en évidence que le comptage manuel n'avait pas identifié un nombre non négligeable de follicules primordiaux. *In fine*, l'algorithme a permis de traiter les coupes histologiques numérisées d'un ovaire complet en moins d'une minute, divisant le temps de traitement habituel par un facteur supérieur à 30. La spécificité et la sensibilité était supérieure à 90 et 65 % respectivement. De plus, l'algorithme a amélioré les mesures que j'avais effectuées en termes de détection optique car il était capable de détecter des follicules primordiaux que je n'avais pas comptés. Le deep learning se basant sur l'apprentissage et l'expérience, ces résultats peuvent encore être améliorés.

Cette technologie innovante et moderne d'évaluation de la réserve ovarienne chez la souris, reposant sur la reconnaissance et de comptage des follicules primordiaux, présente de nombreux avantages par rapport au comptage manuel classique. Outre le considérable gain de temps, cette méthodologie n'est pas dépendante de l'opérateur et donc très reproductible, permettant la comparaison des résultats entre les différentes études, ce qui est aujourd'hui impossible. En effet, le comptage folliculaire étant particulièrement lourd et contraignant, de multiples méthodes permettant de simplifier le comptage ont été proposées dans la littérature. Ainsi, en fonction des études, seulement une coupe sur 5 ou sur 10 est analysée. Des facteurs

Résultats

correcteurs variables, allant d'un facteur 2 à un facteur 80 sont utilisés pour appréhender le contenu total de l'ovaire (Tilly, 2003). Par exemple, dans la littérature, le nombre total de follicules primordiaux varie de 400 à 10.000 pour une souris de même souche et de même âge (Myers *et al.*, 2004). D'autre part, d'autres études ont seulement analysé une partie des ovaires puis ont exprimé les résultats en densité folliculaire ou nombre de follicules par coupe (Jang *et al.*, 2017). Or, la densité folliculaire est un très mauvais reflet du nombre réel de follicule primordiaux, la répartition de ces follicules n'étant pas homogène sur toute la surface ovarienne. L'algorithme mis au point dans ce travail, s'il est généralisé, permettrait de comparer, de manière fiable, les résultats des différentes études.

Une des limites à laquelle nous avons été confrontés est le temps nécessaire à la numérisation des lames puis à la transformation des images obtenues par le scanner de lames virtuelles en images analysables par l'algorithme. Contrairement à l'analyse manuelle, ce temps ne demande pas une participation active humaine mais peut être limitant. Les avancées importantes dans le domaine de la numérisation des lames histologiques vont probablement, et très rapidement, remédier à ces inconvénients. En effet, alors qu'au début de mon travail de comptage, en 2015, la numérisation des lames prenait environ 30 minutes pour un chargeur de 5 lames et nécessitait une intervention humaine régulière pour chaque chargeur, l'achat, en 2017, d'un nouveau scanner plus performant, permet aujourd'hui la numérisation de 250 lames en 12 heures environ, sans participation humaine permettant l'acquisition des images sur une nuit. Au moment de l'écriture de ce manuscrit, un scanner de nouvelle génération, permettant la numérisation de 1000 lames en moins de 2 minutes par lame est maintenant disponible dans le service d'anatomo-pathologie de l'Hôpital Bicêtre. Cette accélération de la numérisation a lieu simultanément avec une amélioration importante de la qualité des images obtenues. De plus, l'analyse des images par l'algorithme pourra désormais se faire directement à partir des images obtenues après numérisation, sans transformation préalable. Ainsi, ces différentes évolutions permettent déjà une amélioration considérable.

Ce premier travail de reconnaissance et de comptage des follicules primordiaux au sein des ovaires de souris ouvre de nombreuses perspectives. Par exemple, le transfert de cette technologie au comptage de toutes les classes folliculaires, du petit follicule primordial au follicule antral, permettrait non seulement une bonne estimation de la réserve ovarienne mais aussi une évaluation de la folliculogénèse. Ce nouvel outil serait très utile pour toutes les équipes s'intéressant à la physiologie ovarienne. Une étape préliminaire a déjà été mise au point avec le développement d'un algorithme de « classification », utilisant également une technique de deep

Résultats

learning et un réseau de neurones à convolution. Celui-ci est capable de classer correctement la grande majorité des follicules préalablement annotés, comme le montre la Figure 23. La prochaine étape sera donc le développement d'un algorithme de détection associé à celui de classification. Cependant, la taille variable des différents follicules est un paramètre essentiel à prendre en compte afin de ne pas compter les mêmes follicules à plusieurs reprises sur plusieurs coupes. La poursuite de ce travail fera l'objet, en collaboration avec Quantmetry, d'un projet de fin d'étude pour des étudiants de l'école nationale de la statistique et de l'analyse de l'information (ENSAI).

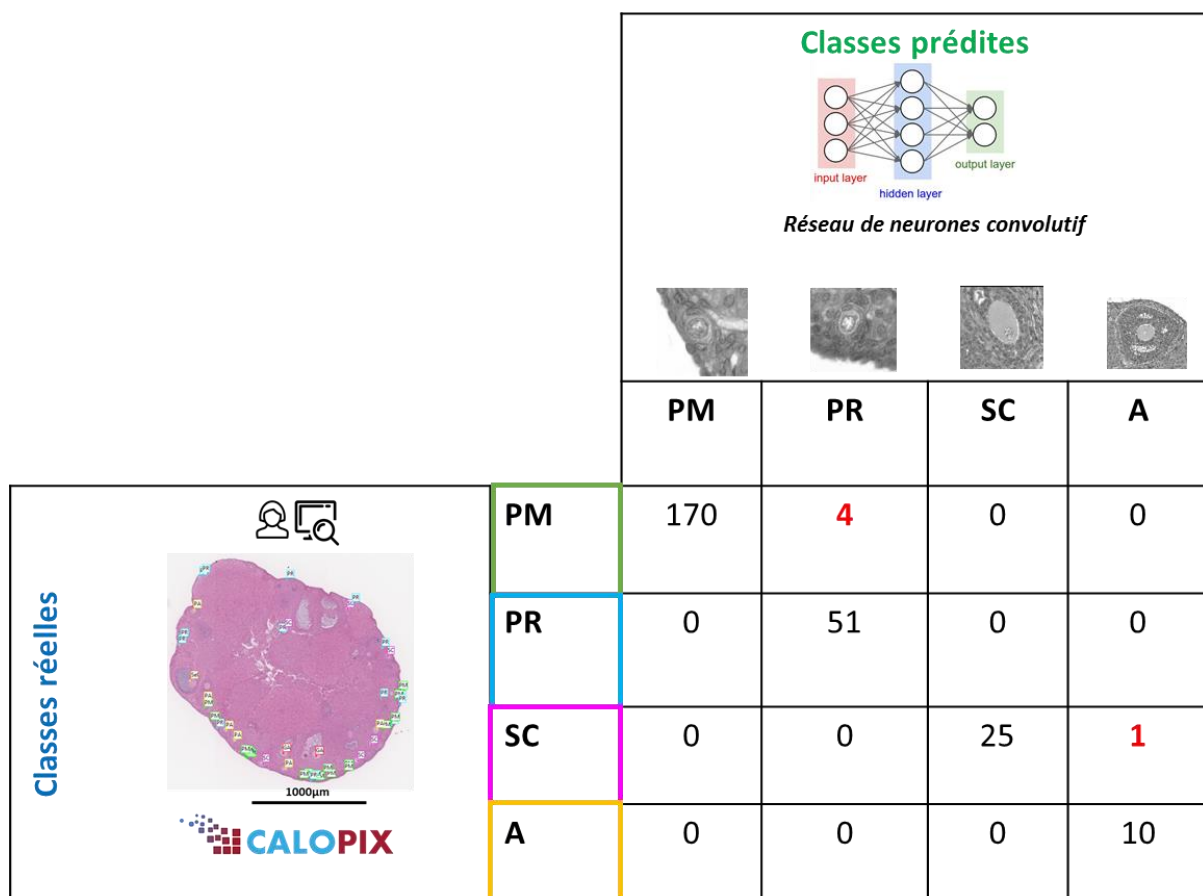


Figure 23. Algorithme de classification des différentes classes de follicules ovariens. Après numérisation de la lame, tous les follicules, quel que soit leur stade de développement (Primordial (PM), Primaire (PR), Secondaire (SC) ou Antral (A)) sont annotés manuellement grâce au logiciel d'analyse d'image Calopix®. L'algorithme analyse ensuite chaque image grâce à un système de réseau de neurones à convolution. La classe réelle correspond à l'analyse manuelle des images. La classe prédite correspond à la prédiction par l'algorithme. Les erreurs de classification sont indiquées en rouge. Très peu de différences entre les classes réelles et prédites sont retrouvées.

Résultats

Grâce à cette étude, une méthodologie d'apprentissage par transfert est en cours de développement pour une application sur des coupes de tissus humains. En effet, le cortex ovarien de souris et celui de la femme présentent de nombreuses similitudes. De plus, mise à part leur taille (environ 30 μm chez la femme et 15 μm chez la souris), les follicules primordiaux humains et murins sont d'apparence identique (Figure 24). L'adaptation de cette technologie à la reconnaissance et au comptage des follicules primordiaux dans le cortex ovarien de femme présenterait de nombreux intérêts comme la recherche de nouveaux marqueurs de la réserve ovarienne et du nombre de follicules primordiaux ou dans le cadre de la préservation de la fertilité féminine.

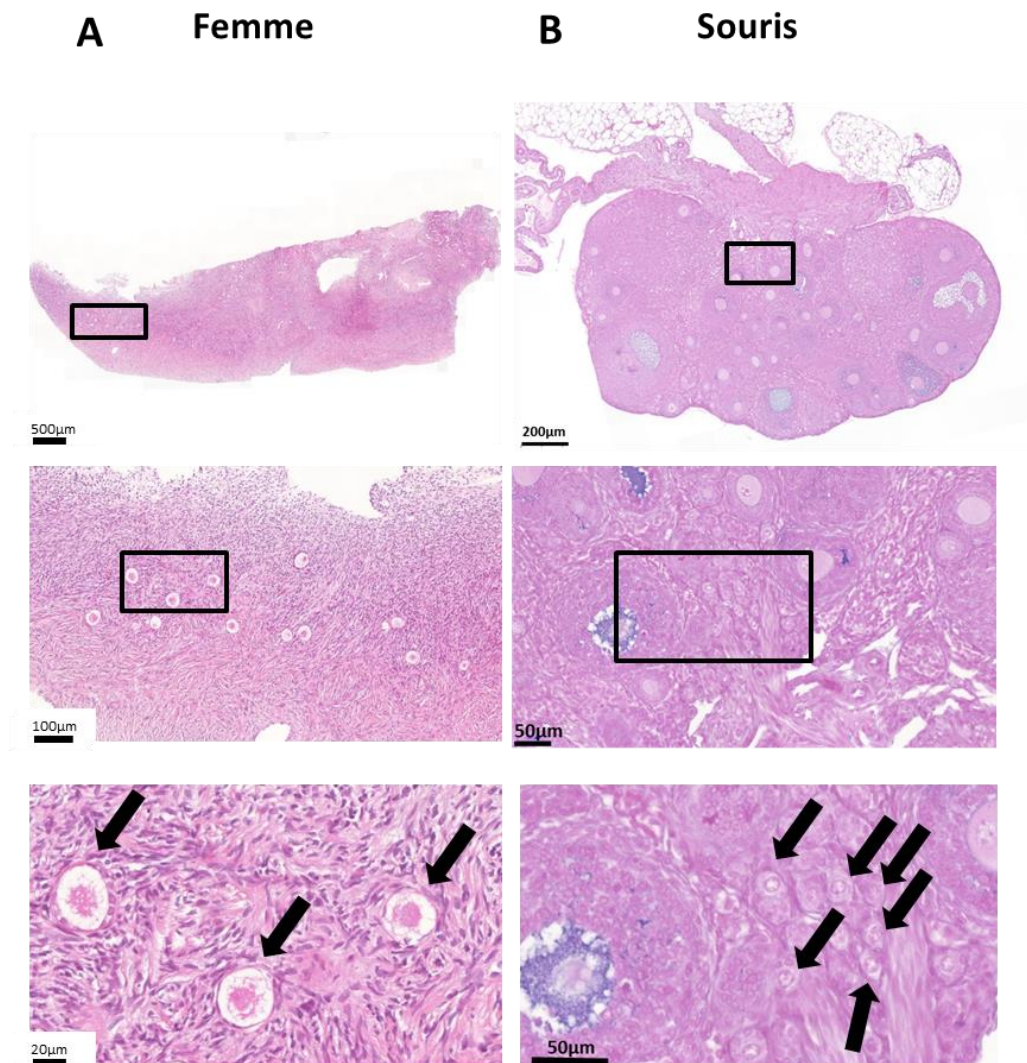


Figure 24. Comparaison histologique d'une coupe d'ovaire de femme et de souris. (A) Fragment de cortex humain obtenu après prélèvement de cortex dans le cadre de préservation de la fertilité. (B) Ovaire entier de souris. Les flèches noires pointent les follicules primordiaux qui ont une morphologie comparable chez la femme et chez la souris, mais une taille différente. L'échelle est indiquée pour chacune des images.

Résultats

En conclusion, ce travail innovant, s'appuyant sur une technologie développée depuis de nombreuses années mais en plein essor actuellement, s'inscrit dans un projet à grande échelle sur la pathologie numérique et sur l'utilisation des différents outils de l'IA dans le domaine médical.

DISCUSSION GENERALE

Ces dernières années, de nombreux travaux cliniques se sont attachés à améliorer le diagnostic, la prise en charge et la surveillance des jeunes patients atteints de cancer. Il est maintenant clairement établi que les excellents taux de guérison sont obtenus au prix d'altérations du potentiel de fertilité. Afin de préserver les gamètes des effets toxiques des traitements, plusieurs techniques, comme la cryopréservation d'ovocytes, d'embryons ou de cortex ovariens peuvent être proposés. Cependant, ces méthodes peuvent être limitées par l'âge, le statut des patients, le type de pathologie et l'urgence à débiter les traitements. De plus, ces techniques peuvent être difficiles à mettre en place et la réutilisation des cellules germinales sous toutes leurs formes reste incertaine. Par ailleurs, du fait de manque de recul, l'impact à long terme de la cryopréservation de cortex ovarien sur la réserve ovarienne n'est pas bien connue. Enfin, si de plus en plus de grossesses sont décrites, ces stratégies ne représentent malheureusement pas des garanties de grossesse pour les patientes.

En conséquence, de nouvelles thérapeutiques, permettant de limiter la perte folliculaire présenteraient de nombreux intérêts. Elles pourraient être utilisées en association avec les techniques existantes, et être administrées quels que soient l'âge, la pathologie ou le traitement proposé. Par ailleurs, en évitant une éventuelle IOP, ils préviendraient également les déficits hormonaux et leurs nombreuses conséquences (retard pubertaire, ostéoporose ...). Ces traitements pourraient être particulièrement intéressant pour les femmes présentant des paramètres de la réserve ovarienne altérés, chez qui aucune méthode de PF n'est actuellement réalisable. Le développement de ces traitements est possible car les mécanismes de la gonadotoxicité sont aujourd'hui de mieux en mieux connus même s'ils ne sont pas encore totalement élucidés et parfois controversés. A ce jour, en fonction des différentes théories de gonadotoxicité, des dizaines de molécules ont été proposées (Roness *et al.*, 2016).

Dans ce travail de thèse, nous avons mis en évidence qu'un traitement par AMH recombinante pourrait permettre de limiter la perte folliculaire liée au Cy, en inhibant l'activation accélérée des follicules de réserve. Avant de replacer cette nouvelle thérapeutique dans le paysage de la préservation de la fertilité du « futur », il est important de rappeler brièvement les différents mécanismes potentiels de gonadotoxicité des chimiothérapies.

I. Mécanismes de gonadotoxicité des chimiothérapies

A. Modèles expérimentaux

Si des études histologiques d'ovaires humains ont été effectuées il y a de nombreuses années pour évaluer l'impact de la maladie et des traitements sur les gonades (Himmelstein-Braw *et al.*, 1978; Familiari *et al.*, 1993), elles sont plus difficilement réalisables aujourd'hui. L'évaluation de la gonadotoxicité des chimiothérapies se base essentiellement sur des modèles de cultures organotypiques ou cellulaires *in vitro* ou sur des études *in vivo* chez le rat ou la souris. Enfin, si les modèles murins sont couramment utilisés, il est cependant important de rappeler que des résultats obtenus chez la souris sont à extrapoler avec précaution à la femme. En effet, non seulement, mimer les doses et protocoles est souvent difficile mais aussi la physiologie ovarienne et la réponse aux traitements peuvent différer.

L'analyse *in vitro* est une technique rapide et relativement peu coûteuse pour évaluer l'impact de différents traitements sur des organes ou des cellules. Des lignées cellulaires de cellules de la granulosa ou de cellules du stroma ovarien sont aujourd'hui disponibles et les ovaires sont des organes qu'il est possible de mettre en culture pendant plusieurs jours. Cependant, comme nous l'avons développé dans la discussion de l'article 1, nous avons été confrontés aux limites de ces modèles, notamment lors de l'étude des mécanismes permettant à l'AMH de bloquer l'entrée en croissance des follicules primordiaux.

Afin de pouvoir analyser l'impact de divers traitements sur les ovaires de manière plus « intégrée », il est courant d'utiliser des modèles murins. En effet, la folliculogenèse et la fonction de reproduction présente de nombreuses similitudes avec celles de la femme. La technique de référence pour évaluer la réserve ovarienne est encore, dans ce modèle, le comptage, le plus exhaustif possible, des follicules primordiaux. Réalisée en général manuellement, cette méthode est longue, fastidieuse et dépendante de l'opérateur. Elle peut représenter, dans certains cas, un frein à la réalisation de nouvelles expérimentations. De plus, il est très difficile aujourd'hui de comparer les résultats obtenus entre les différentes équipes. Afin de pallier ces difficultés et grâce à l'utilisation d'un scanner de lames virtuelles permettant d'utiliser des outils modernes d'intelligence artificielle, nous avons mis au point une technique de comptage automatisée des follicules primordiaux, présentées dans l'article 2. Cette technique innovante permet de compter les follicules de réserve de manière efficace et rapide. Un des objectifs est de valider cet algorithme puis de le diffuser aux équipes utilisant la souris ou le rat pour étudier la reproduction. Par ailleurs, nous cherchons à améliorer cette méthode afin de reconnaître et compter toutes les

classes de follicules présents dans l'ovaire ce qui permettra d'évaluer l'impact global de la chimiothérapie et/ou des traitements sur l'ovaire.

Par ailleurs, une méthodologie d'apprentissage par transfert est en cours pour une application sur des coupes de tissus humains. Cette extension serait particulièrement utile non seulement en pratique clinique courante mais aussi en recherche fondamentale. En effet, un modèle plus sophistiqué basé sur la transplantation de fragments de cortex ovarien humain chez des souris immuno-déficientes est également utilisée et permet l'évaluation de la toxicité des traitements sur du tissu humain au sein d'un environnement plus physiologique (Oktem and Oktay, 2007).

B. Altération de l'ADN, atrophie folliculaire et voies de réparation

Les différentes molécules utilisées lors des chimiothérapies induisent des altérations de l'ADN des ovocytes et/ou des cellules de la granulosa des follicules en croissance ou même au repos. Les cassures double brin (CDB) sont les principales lésions de l'ADN provoquées par ces agents cytotoxiques et peuvent, à leur tour, conduire à soit des voies de réparation de l'ADN permettant la survie cellulaire soit la mort de la cellule par apoptose (Bedeschi *et al.*, 2016) (Winship *et al.*, 2018). Selon cette théorie, la chimiothérapie induit une déplétion folliculaire par atteinte directe des follicules primordiaux entrant massivement en atrophie.

Les voies de réparation de l'ADN en réponse à la chimiothérapie diffèrent en fonction du type de traitements et peuvent impliquer, par exemple, les protéines pATM, RAD51 ou PARP1 (Winship *et al.*, 2018). Lorsque ces voies de réparation ne sont pas suffisamment activées, les CDB induisent une apoptose cellulaire et l'apoptose des follicules primordiaux. Ce mécanisme se fait principalement par l'intermédiaire de la protéine p63 (et plus particulièrement l'isoforme TAp63) qui active les protéines BAX (Bcl-2- Antagoniste homologue de la protéine X) et BAK (Bcl-2 antagoniste killer). L'activation de BAX/BAK peut être transmise par TAp73 ou être secondaire à l'activation des protéines PUMA (p53 Up Modulator of Apoptosis) et NOXA (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1) (Kerr *et al.*, 2012). Ces mécanismes sont particulièrement complexes car ils diffèrent en fonction du type de molécule de chimiothérapie et ne sont donc pas toutes présentées ici (Winship *et al.*, 2018).

Chacun des facteurs impliqués dans la cascade apoptotique peut représenter une cible potentielle des traitements permettant de limiter les effets des traitements cytotoxiques sur l'ovaire (Figure 25) (Rones *et al.*, 2016).

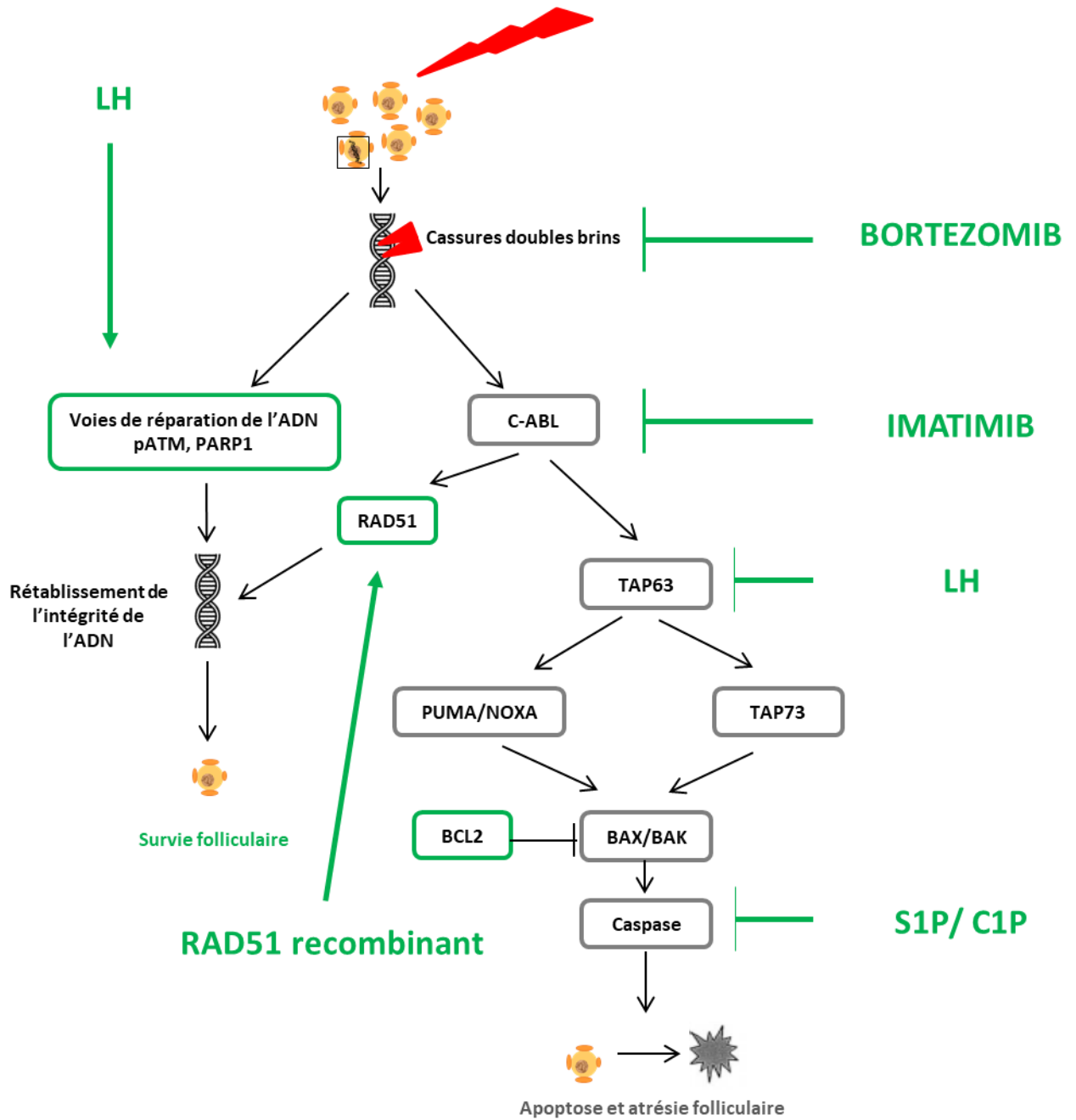


Figure 25. Première hypothèse de gonadotoxicité de la chimiothérapie: apoptose des follicules primordiaux. La chimiothérapie provoque des cassures double brin de l'ADN au sein de l'ovocyte. Si elles ne sont pas réparées, elles entraînent l'atrésie folliculaire par apoptose. Plusieurs molécules (en vert), agissant principalement sur les différentes étapes de la voie apoptotique, ont été proposées afin d'éviter l'atrésie folliculaire et maintenir le pool des follicules de réserve.

C. Recrutement accéléré des follicules primordiaux

Une théorie plus récente suggère que la chimiothérapie, comme le Cy ou le cisplatine, induit une déplétion folliculaire par une entrée en croissance massive des follicules au repos, survenant simultanément avec une apoptose des follicules en croissance (Kalich-Philosoph *et al.*, 2013). Le recrutement des follicules primordiaux serait secondaire à une activation de la voie de signalisation PI3K, dont le rôle dans la quiescence du follicule a été bien établi par de nombreux modèles de souris « knock-out » ainsi que des études *in vitro* sur des fragments de cortex ovarien humain (Adhikari and Liu, 2009; Li *et al.*, 2010). Le mécanisme moléculaire par lequel la chimiothérapie active la voie PI3K au sein des follicules primordiaux n'est pas connu à ce jour. De plus, les agents cytotoxiques détruisent également les follicules en croissance entraînant une réduction de la sécrétion d'AMH et donc une perte de l'inhibition de l'entrée en croissance exercée par cette hormone sur le pool de follicules primordiaux ce qui renforcerait le recrutement folliculaire (Figure 26). Dans cette étude princeps, le fait qu'aucun follicule primordial ne montrait des signes d'atrésie venait conforter cette hypothèse (Kalich-Philosoph *et al.*, 2013).

Cet effet a été nommé « burn-out » et a été proposé pour expliquer la gonadotoxicité du Cy chez la souris. Dans notre travail de thèse, nous avons commencé par confirmer ces données (article 1). Depuis d'autres équipes ont également retrouvé des résultats similaires avec le Cy chez la souris (Chen *et al.*, 2016) ou chez la femme (Lande *et al.*, 2017) mais aussi avec d'autres agents cytotoxiques comme le cisplatine (Chang *et al.*, 2015; Jang *et al.*, 2016). De plus, cette théorie pourrait également expliquer l'altération de la réserve ovarienne induite par la présence d'un endométriome ovarien (Kitajima *et al.*, 2014) ou la perte folliculaire massive secondaire à la transplantation de cortex ovarien (Gavish *et al.*, 2015, 2018).

De nombreuses recherches ont été effectuées afin de développer de nouvelles molécules qui permettraient de préserver la réserve ovarienne en inhibant la voie de la PI3K et l'activation folliculaire.

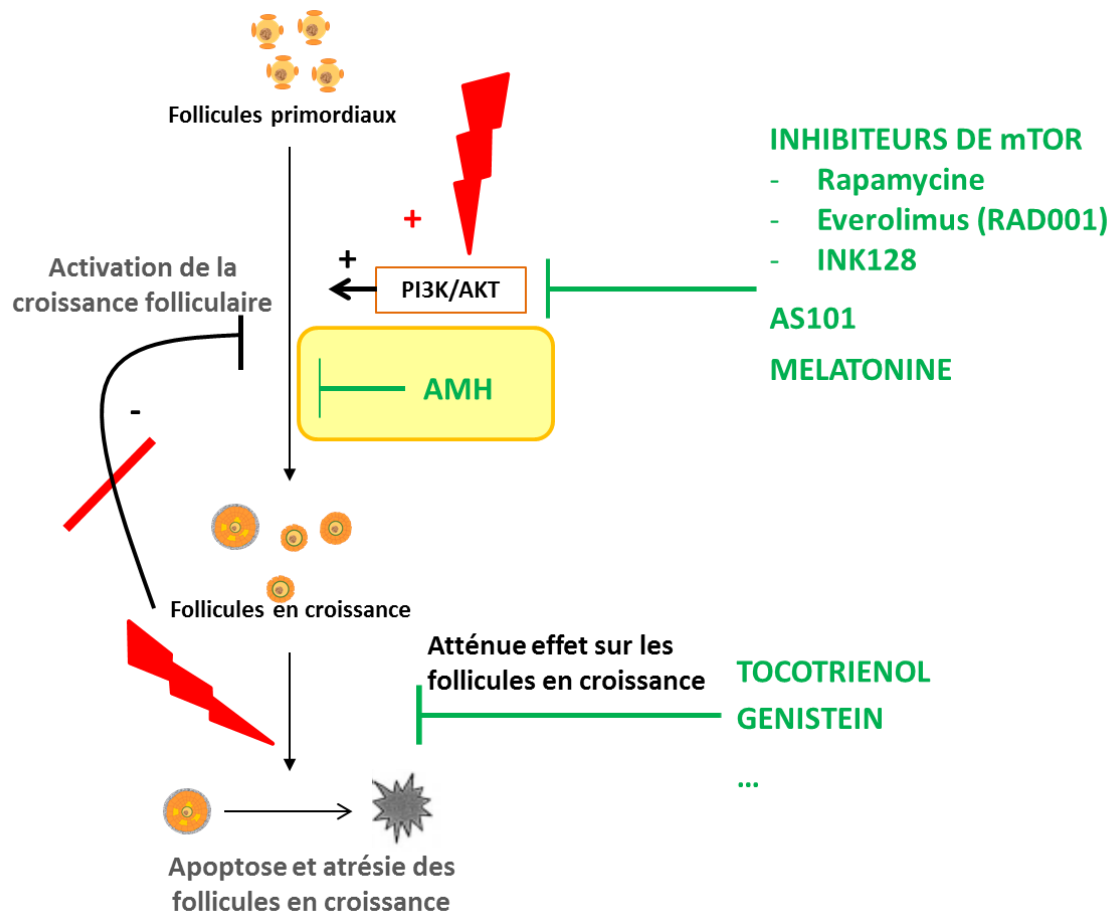


Figure 26. Seconde hypothèse de gonadotoxicité de la chimiothérapie: effet « burn out ». La chimiothérapie induit d'une part une activation de la voie PI3K et d'autre part une atresie des follicules en croissance. Ces deux actions entraînent une déplétion folliculaire par entrée en croissance massive des follicules primordiaux. Des molécules permettant de bloquer la voie PI3K ou l'apoptose des follicules en croissance ont été développées afin de bloquer le recrutement accéléré des follicules primordiaux (en vert). L'AMH permettrait d'inhiber spécifiquement cette activation folliculaire.

D. Altérations stromales et vasculaires

La chimiothérapie peut également être à l'origine d'altérations du stroma ovarien et de la vascularisation provoquant une perte folliculaire (Soleimani *et al.*, 2011; Ben-Aharon *et al.*, 2012). En effet, une atteinte vasculaire a été mise en évidence chez la femme (Ben-Aharon *et al.*, 2012) et chez la souris (Bar-Joseph *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'analyse histologique de tissu ovarien humain préalablement exposé à la chimiothérapie a montré un épaissement et une hyalinisation du stroma cortical associé à une désorganisation des vaisseaux et une fibrose corticale (Meirow *et al.*, 2007).

II. Agents permettant de limiter la déplétion folliculaire liée à la chimiothérapie

Grâce à l'amélioration de la compréhension des mécanismes par lesquels la chimiothérapie affecte les ovaires, de très nombreuses équipes ont cherché à développer des traitements permettant de limiter, *in vivo*, la déplétion folliculaire (Bedoschi *et al.*, 2016; Roness *et al.*, 2016). A ce jour, ces thérapeutiques sont presque toutes au stade de recherche fondamentale car seuls les agonistes de la GnRH ont été utilisés, dans cette indication, en pratique clinique chez la femme (Fisch and Abir, 2018). Le mécanisme permettant d'expliquer le rôle potentiellement protecteur de ces différents agents est plus ou moins clair. Plus de 50 articles originaux ont été publiés en moins de 20 ans dont plus de la moitié pendant mes années de thèse. Le tableau 2 résume, de manière non exhaustive, les différents agents qui ont été testés, leur mécanisme d'action et le mécanisme proposé pour expliquer l'éventuelle protection ovarienne.

La grande majorité de ces études a été réalisée chez des rongeurs, pubères ou non, qui ont reçu le traitement, *in vivo*, en association avec un agent gonadotoxique. Les principales chimiothérapies utilisées étaient du cisplatine, du cyclophosphamide ou de la doxorubicine. Si les résultats de ces travaux ont montré, pour la plupart, un rôle protecteur sur la déplétion folliculaire induite par la chimiothérapie, certaines études montrent des résultats contradictoires. Ainsi, le rôle protecteur de l'imatimib ou des agonistes de la GnRH est encore très débattu aujourd'hui. Concernant ce dernier traitement, de nombreuses études cliniques et essais randomisés ont été menés afin d'évaluer le potentiel rôle protecteur des agonistes de la GnRH sur la fonction et la réserve ovarienne (Munster *et al.*, 2012; Moore *et al.*, 2015; Demeestere *et al.*, 2016). A ce jour, plusieurs revues systématiques ou méta-analyses ont été publiées avec des conclusions également contradictoires, l'utilisation de ces traitements en préservation de la fertilité étant largement discutée (Lambertini *et al.*, 2016; Donnez and Dolmans, 2017; Oktay *et al.*, 2017).

Tableau 2 : Différentes molécules proposées chez la souris pour limiter la déplétion folliculaire induite par la chimiothérapie.

Mécanisme proposé de protection ovarienne	Molécule		Références
Inhibition de l'entrée en croissance des follicules primordiaux	Rapamycine	Inhibiteur de mTOR	(Zhou <i>et al.</i> , 2017)
	Everolimus	Inhibiteur de mTORC1/mTORC2	(Goldman <i>et al.</i> , 2017a)
	Mélatonine	Hormone dérivée de la sérotonine, modulateur de la voie PI3K	(Jang <i>et al.</i> , 2016, 2017)
	AS101	Modulateur de la voie PI3K	(Kalich-Philosoph <i>et al.</i> , 2013)
	AMH	Non connu	(Kano <i>et al.</i> , 2017) Sonigo et al, soumis
Inhibition de l'apoptose des follicules primordiaux	RAD51	Réparateur de l'ADN	(Kujjo <i>et al.</i> , 2010)
	Bortezomib	Inhibiteur compétitif du protéasome, réparation de l'ADN	(Roti Roti <i>et al.</i> , 2014)
	GNF2	Inhibiteur spécifique de c-ABL	(Maiani <i>et al.</i> , 2012)
	LH	Gonadotrophine	(Rossi <i>et al.</i> , 2017)
	Imatimib	Inhibiteur compétitif des récepteurs à activité tyrosine kinase, dont c-ABL	(Gonfloni <i>et al.</i> , 2009; Maiani <i>et al.</i> , 2011, 2012; Kerr <i>et al.</i> , 2012; Kim <i>et al.</i> , 2013; Morgan <i>et al.</i> , 2013)
	Sphingosine 1 Phosphate Céramide 1 Phosphate	Régulateur de la prolifération et migration cellulaire, apoptose et angiogenèse	(Hancke <i>et al.</i> , 2007; Kaya <i>et al.</i> , 2008; Li <i>et al.</i> , 2014; Pascuali <i>et al.</i> , 2018)
Effet vasculaire + action sur le recrutement ?	Agonistes et antagonistes de la GnRH	Suppression de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique	(Meirow <i>et al.</i> , 2004; Kishk and Mohammed Ali, 2013; Detti <i>et al.</i> , 2014; Hasky <i>et al.</i> , 2015; Horicks <i>et al.</i> , 2018)
	G-CSF	Facteur de croissance de lignée leucocytaire	(Skaznik-Wikiel <i>et al.</i> , 2013; Akdemir <i>et al.</i> , 2014)
Possibles actions : - anti-apoptotique - anti-oxydante - anti-inflammatoire Diminution du recrutement ?	Tamoxifène	Inhibiteur sélectif du récepteur des œstrogènes	(Ting and Petroff, 2010; Piasecka-Srader <i>et al.</i> , 2015)
	Herbes chinoises	Phyto-œstrogènes	(Xia <i>et al.</i> , 2014)
	Fenouil	Phyto-œstrogène	(Hassanpour <i>et al.</i> , 2017)
	Citrate de Sildenafil	Inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5	(Taskin <i>et al.</i> , 2015)
	Tocotrienol	Vitamine E	(Saleh <i>et al.</i> , 2015)
	Génisteine	Phyto-œstrogènes	(Saleh and Mansour, 2016)
	Polysaccharide dérivé de Sepia esculenta	Polysaccharide	(Liu <i>et al.</i> , 2016)

Pour que ces molécules puissent être utilisées en pratique clinique et étudiées chez la femme, il est primordial qu'elles n'interfèrent pas avec l'action thérapeutique de la chimiothérapie. Or, l'apoptose représente, pour certains traitements, le principe clef de son action anti-cancéreuse et les voies de l'apoptose peuvent être similaires dans les follicules primordiaux et dans les cellules malignes. Certaines molécules pourraient diminuer l'effet anti-cancéreux de la chimiothérapie en inhibant l'apoptose également dans les cellules tumorales, ce qui reste le principal objectif de ces traitements. Par ailleurs, en bloquant la mort des ovocytes alors qu'ils présentent des altérations de l'ADN, certaines molécules pourraient permettre la survie de cellules germinales endommagées et donc engendrer une infertilité, un risque accru de fausses couches spontanées ou de malformations fœtales. Enfin, la voie de la PI3K est une voie ubiquitaire, présente dans toutes les cellules de l'organisme. Les molécules modulant cette voie, comme l'AS101 ou la mélatonine, pourraient interférer dans divers processus physiologiques.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons utilisé de l'AMH recombinante, qui présente de nombreux avantages, pour protéger le pool des follicules primordiaux de l'action toxique du cyclophosphamide. Dans l'Article 1 présenté dans ce manuscrit, nous avons montré qu'une administration d'AMH permettait de limiter la déplétion folliculaire liée au Cy en inhibant le recrutement des follicules en quiescence. Nos résultats sont concordants avec ceux récemment publiés par une autre équipe qui a indiqué des effets similaires, non seulement avec le Cy mais aussi avec d'autres chimiothérapies comme le cisplatine et la doxorubicine (Kano *et al.*, 2017). De plus, nous avons montré, pour la première fois, que l'autophagie pouvait être impliquée dans ce processus. Ces résultats sont également en accord avec d'autres études récentes qui ont mis en évidence que des modulations de mTOR ou du complexe mTORC1, connu pour activer l'autophagie, permettaient de préserver la réserve ovarienne (Goldman *et al.*, 2017a; Zhou *et al.*, 2017). Cependant, l'autophagie est un processus ubiquitaire, impliqué dans de nombreux phénomènes et des modifications de sa régulation pourraient théoriquement interférer avec d'autres mécanismes physiologiques. Un des principaux avantages de l'utilisation de l'AMH dans cette situation est son action ciblée sur les cellules exprimant le récepteur spécifique AMHR2, sans interaction avec l'efficacité de la chimiothérapie. De plus, l'AMH pourrait être utilisée chez toutes les patientes, quels que soient leur âge, leur réserve ovarienne ou la pathologie, seule ou en association avec les techniques déjà existantes. Ce point est particulièrement intéressant car les méthodes de préservation de la fertilité féminine disponibles aujourd'hui peuvent être limitées par ces différents critères.

Discussion générale

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse et les données de la littérature montrent que l'AMH recombinante pourrait être une nouvelle stratégie particulièrement intéressante dans l'arsenal thérapeutique de la PF féminine. De manière intéressante, d'autres applications thérapeutiques potentielles de l'AMH recombinante sont également envisageables.

II. AMH recombinante en thérapeutique

Au cours de ces dernières décennies, la purification et le développement de l'AMH recombinante (Donahoe *et al.*, 2003) a permis d'explorer diverses actions thérapeutiques de cette molécule dans des modèles de culture cellulaire ou *in vivo* chez les rongeurs (Kushnir *et al.*, 2017). Les deux principaux champs d'action qui ont été évalués sont la reproduction et la prise en charge des cancers gynécologiques.

A. Applications thérapeutiques dans le domaine de la reproduction

Comme nous l'avons discuté ci-dessus, l'AMH recombinante pourrait représenter un nouveau traitement particulièrement intéressant en PF pour limiter la gonadotoxicité de la chimiothérapie. Par ailleurs, la théorie du « burn out » a été récemment étendue à d'autres situations connues pour engendrer une déplétion folliculaire, comme la présence d'endométriomes (Kitajima *et al.*, 2014) ou la manipulation de cortex ovarien prélevé dans le cadre de la PF (Gavish *et al.*, 2015, 2018). Par conséquent, un traitement par AMH *in vivo* ou *in vitro* pourrait également protéger le pool folliculaire dans ces conditions. Ce traitement s'inscrit dans une nouvelle utilisation thérapeutique visant à manipuler les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'entrée en croissance des follicules primordiaux pour optimiser la fertilité. Ces traitements ont particulièrement été étudiés afin d'optimiser la technique de cryopréservation de tissu ovarien (Meirow *et al.*, 2015). Certains traitements, comme l'AMH, permettent d'inhiber la croissance folliculaire et de préserver des follicules quiescents au sein de fragments de cortex ovariens dans le but d'augmenter la durée de vie du greffon (Kong *et al.*, 2016). D'autre part, des traitements stimulateurs de la voie de la PI3K et inhibiteurs de la phosphatase PTEN visant au contraire à stimuler l'activation des follicules en dormance chez des femmes présentant une IOP ont été développés. Après la greffe, ces follicules ont poursuivi une folliculogenèse complète jusqu'à la maturation folliculaire et ont permis la naissance d'enfants en bonne santé (Zhai *et al.*, 2016). Ces traitements dits d'activation *in vitro* peuvent être des activateurs de la voie PI3K ou des modulateurs de la voie Hippo, également impliquée dans ce processus (Kawamura *et al.*, 2013). Des antagonistes de l'AMH pourraient également être utilisés dans ce contexte.

Discussion générale

La principale cause de diminution de la réserve ovarienne est physiologique et liée à l'âge. Si la souris ne présente pas d'épuisement du stock folliculaire à sa mort, la femme a une durée de vie reproductive limitée par la quantité de follicules primordiaux présents dans son cortex ovarien. Un modèle mathématique a suggéré que l'administration exogène d'AMH pourrait limiter cette déplétion folliculaire et ainsi retarder l'âge de la ménopause (Margolskee and Selgrade, 2013). Cependant, l'altération quantitative du stock folliculaire est associée à une altération ovocytaire qualitative, liée à une accumulation d'anomalies génétiques secondaires à une diminution de l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN avec l'âge (Broekmans *et al.*, 2009). Cette donnée modère l'utilisation potentielle de l'AMH pour augmenter la durée de vie reproductive. Néanmoins, ce traitement pourrait permettre de retarder les effets secondaires et les complications hormonales et vasculaires de la ménopause. Ainsi, les avantages et les inconvénients d'une telle approche doivent être évalués.

De plus, les différents rôles exercés par l'AMH tout au long de la folliculogénèse ont permis d'émettre l'hypothèse que l'AMH pourrait également représenter un nouveau moyen contraceptif. Des études évaluant l'administration exogène quotidienne en continue d'AMH chez des souris pubères ont montré une altération des cycles œstriens ainsi qu'une diminution drastique de la fertilité et ce de manière dose-dépendante confirmant ainsi cette hypothèse (Hayes *et al.*, 2016; Kano *et al.*, 2017). Nos résultats vont dans ce sens mais le mode d'administration hebdomadaire peut expliquer que nous ne mettons pas en évidence d'altération majeure de la cyclicité chez les souris traitées par AMH pendant 4 semaines. Des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces données et d'évaluer les potentiels effets secondaires de ce traitement s'il est administré au long cours.

Enfin, les concentrations élevées d'AMH circulantes mesurées chez les femmes présentant un Syndrome des Ovaires Polykystiques et l'implication de cette hormone dans la physiopathologie de ce syndrome permettent de supposer que le développement d'antagonistes de l'AMH pourrait représenter une nouvelle option thérapeutique pour l'induction de l'ovulation chez ces patientes. L'AMH pourrait agir localement au niveau ovarien, ou comme cela a été suggéré récemment également au niveau hypothalamo-hypophysaire (Cimino *et al.*, 2016). Ces données sont encore à l'état de spéculations et doivent être validées formellement.

B. Applications thérapeutiques en oncologie

Le rôle princeps de l'AMH est d'induire la régression des canaux de Müller au cours du développement embryonnaire. La plupart des tumeurs de l'appareil génital dérivant de ces structures, il a été proposé que l'AMH pourrait inhiber la croissance de certaines tumeurs gynécologiques (Kim *et al.*, 2014). En agissant uniquement sur les cellules exprimant l'AMHR2, cette molécule pourrait agir comme une thérapie ciblée (Bakkum-Gamez *et al.*, 2008; Kersual *et al.*, 2014).

L'AMH a d'abord été proposée comme une thérapie potentielle dans le cancer de l'ovaire. En effet, il a été montré, chez le rongeur, que l'AMH pouvait induire une inhibition de la prolifération et l'apoptose de cellules cancéreuses épithéliales ovariennes *in vitro* et *in vivo* (La Marca and Volpe, 2007). Ces résultats semblent transposables chez la femme, car les cellules ovariennes cancéreuses humaines expriment l'AMHR2 et leur croissance *in vitro* est inhibée par l'AMH recombinante (Masiakos *et al.*, 1999). L'endomètre et le col de l'utérus dérivent de l'épithélium cœlomique et expriment aussi l'AMHR2. Des études *in vitro* ont également mis en évidence ce rôle anti-prolifératif de l'AMH sur des lignées cancéreuses humaines endométriales ou du col utérin (Renaud *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2015). Enfin, une expression faible de l'AMHR2 a également été documentée dans du tissu mammaire humain dans des conditions physiologiques mais aussi en situation pathologique ou dans des lignées cellulaires cancéreuses mammaires. L'AMH semble également exercer un effet anti-prolifératif sur ces cellules (Segev *et al.*, 2001).

En conclusion, l'AMH recombinante, ou ses antagonistes, peuvent représenter une nouvelle thérapie ciblée et innovante avec un large spectre d'applications ne se limitant pas à la PF. Cependant, à ce jour elle n'a jamais été testée chez la femme et de large études complémentaires, tant fondamentales que cliniques, sont nécessaires.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et Perspectives

Au cours de ces dernières années, la fertilité après cancer a pris une place de plus importante dans la prise en charge des enfants et adultes jeunes atteints de pathologies malignes. Une consultation spécialisée et précoce de PF est aujourd'hui recommandée. Au décours de cette consultation, une éventuelle technique permettant de préserver des gamètes peut être mise en place. Cependant, les différentes méthodes actuellement disponibles chez la femme peuvent paraître lourdes et ne sont parfois pas accessibles à toutes les patientes. De plus, du fait du manque de recul, les chances de grossesse suite à la réutilisation des gamètes congelés ne sont pas encore bien connues. Aussi, de nombreuses équipes cherchent à améliorer les technologies déjà existantes ou à développer de nouvelles techniques de PF afin d'optimiser les chances de grossesses futures pour ces patientes. Dans ce travail de thèse, nous avons montré que des injections d'AMH recombinante permettaient de limiter la déplétion folliculaire induite par la chimiothérapie, et plus spécifiquement le cyclophosphamide, chez la souris pubère. Si ces résultats sont confirmés, ce traitement pourrait être utilisé chez les jeunes filles ou femmes en âge de procréer, quels que soient leur âge, leur réserve ovarienne ou leur pathologie, afin de limiter, *in vivo*, la gonadotoxicité de la chimiothérapie et ainsi favoriser les chances de grossesses spontanées à distance des traitements.

Ce travail de thèse a permis d'autres avancées particulièrement intéressantes. Tout d'abord, sur le plan fondamental, nous avons mis en évidence que l'autophagie pouvait être un des mécanismes impliqués dans l'inhibition du recrutement folliculaire exercée par l'AMH. Si ces résultats sont confirmés, ce travail aura contribué à une meilleure compréhension de la régulation de la folliculogénèse. De plus, nous avons développé une nouvelle méthode de comptage des follicules primordiaux chez la souris à l'aide d'une approche d'intelligence artificielle. Cette technologie innovante pourra permettre de faciliter grandement l'analyse des ovaires dans un modèle murin, couramment utilisé pour étudier la reproduction. Ce projet s'intègre dans un projet pilote de pathologie numérique et pourrait être transposé chez la femme.

La consultation spécialisée d'oncofertilité a également pour objectif de renseigner les patients sur leur future fertilité après cancer. Cependant, l'impact de la chimiothérapie sur la fonction de reproduction est très variable : pour une même classe d'âge et pour un même traitement, la gonadotoxicité n'est pas équivalente chez toutes les patientes. Il semble donc exister une susceptibilité individuelle de chaque patiente qu'il n'est pas possible d'évaluer à ce jour. Par ailleurs, certains polymorphismes de gènes impliqués dans la méiose ou dans la folliculogénèse ont été retrouvés associés à l'âge de la ménopause. Ces polymorphismes pourraient également influencer la susceptibilité des gonades à la chimiothérapie. Afin de confirmer cette hypothèse,

Conclusion et Perspectives

nous avons mis en place, en parallèle de ma thèse, un projet hospitalier de recherche clinique (PHRC) qui a pour objectif principal de rechercher une association entre l'atteinte de la réserve ovarienne à distance des traitements anti-cancéreux et la présence de certains polymorphismes génétiques. Des dosages d'AMH et comptages folliculaires avant la première séance de chimiothérapie puis régulièrement 1 à 5 ans à la fin du traitement seront réalisés. Ce projet de recherche translationnelle est en cours de mise en place et vise à découvrir des facteurs génétiques de susceptibilité à la chimiothérapie afin de mieux informer les patientes et de permettre une prise en charge optimale avec des techniques de préservation plus lourde (congélation de cortex) pour les patientes les plus affectées. La lettre d'intention de ce PHRC est présentée en annexe.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Adams GP, Singh J, Baerwald AR. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. *Theriogenology* 2012;**78**:1733–1748.
- Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev* 2009;**30**:438–464.
- Akdemir A, Zeybek B, Akman L, Ergenoglu AM, Yeniel AO, Erbas O, Yavasoglu A, Terek MC, Taskiran D. Granulocyte-colony stimulating factor decreases the extent of ovarian damage caused by cisplatin in an experimental rat model. *J Gynecol Oncol* 2014;**25**:328–333.
- Alain Gougeon. The early stages of follicular growth. *Biol Pathol Oocyte Role Infertil Reprod Med*. 2013: cambridge.
- Albamonte MS, Willis MA, Albamonte MI, Jensen F, Espinosa MB, Vitullo AD. The developing human ovary: immunohistochemical analysis of germ-cell-specific VASA protein, BCL-2/BAX expression balance and apoptosis. *Hum Reprod Oxf Engl* 2008;**23**:1895–1901.
- Alvaro Mercadal B, Imbert R, Demeestere I, Gervy C, De Leener A, Englert Y, Costagliola S, Delbaere A. AMH mutations with reduced in vitro bioactivity are related to premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod Oxf Engl* 2015;**30**:1196–1202.
- Anders C, Marcom PK, Peterson B, Gu L, Unruhe S, Welch R, Lyons P, Behera M, Copland S, Kimmick G, *et al*. A pilot study of predictive markers of chemotherapy-related amenorrhea among premenopausal women with early stage breast cancer. *Cancer Invest* 2008;**26**:286–295.
- Anderson RA. Can Ovarian Reserve Assessment Predict Fertility following Breast Cancer Treatment? *Womens Health* 2011;**7**:623–625.
- Anderson RA, Cameron DA. Pretreatment serum anti-müllerian hormone predicts long-term ovarian function and bone mass after chemotherapy for early breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;**96**:1336–1343.
- Assi J, Santos J, Bonetti T, Serafini PC, Motta ELA, Chehin MB. Psychosocial benefits of fertility preservation for young cancer patients. *J Assist Reprod Genet* 2018;

Références bibliographiques

- Azim AA, Costantini-Ferrando M, Oktay K. Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2008;**26**:2630–2635.
- Azim HA, Kroman N, Paesmans M, Gelber S, Rotmensz N, Ameys L, De Mattos-Arruda L, Pistilli B, Pinto A, Jensen M-B, *et al.* Prognostic impact of pregnancy after breast cancer according to estrogen receptor status: a multicenter retrospective study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2013;**31**:73–79.
- Azim HA, Peccatori FA, Azambuja E de, Piccart MJ. Motherhood after breast cancer: searching for la dolce vita. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011;**11**:287–298.
- Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, Leeuwen EC van, Themmen AP, Grootegoed JA. Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 1995;**136**:4951–4962.
- Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. *Fertil Steril* 2003;**80**:116–122.
- Baillet A, Mandon-Pepin B. Mammalian ovary differentiation - a focus on female meiosis. *Mol Cell Endocrinol* 2012;**356**:13–23.
- Baker TG. A QUANTITATIVE AND CYTOLOGICAL STUDY OF GERM CELLS IN HUMAN OVARIES. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1963;**158**:417–433.
- Bakkum-Gamez JN, Aletti G, Lewis KA, Keeney GL, Thomas BM, Navarro-Teulon I, Cliby WA. Müllerian inhibiting substance type II receptor (MISIIR): a novel, tissue-specific target expressed by gynecologic cancers. *Gynecol Oncol* 2008;**108**:141–148.
- Bar-Joseph H, Ben-Aharon I, Tzabari M, Tsarfaty G, Stemmer SM, Shalgi R. In vivo bioimaging as a novel strategy to detect doxorubicin-induced damage to gonadal blood vessels. *PloS One* 2011;**6**:e23492.

Références bibliographiques

- Barton SE, Missmer SA, Berry KF, Ginsburg ES. Female cancer survivors are low responders and have reduced success compared with other patients undergoing assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2012;**97**:381–386.
- Beckmann MW, Dittrich R, Findeklee S, Lotz L. Surgical Aspects of Ovarian Tissue Removal and Ovarian Tissue Transplantation for Fertility Preservation. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2016;**76**:1057–1064.
- Bedoschi G, Navarro PA, Oktay K. Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact. *Future Oncol Lond Engl* 2016;**12**:2333–2344.
- Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 1994;**79**:415–425.
- Ben-Aharon I, Meizner I, Granot T, Uri S, Hasky N, Rizel S, Yerushalmi R, Sulkes A, Stemmer SM. Chemotherapy-induced ovarian failure as a prototype for acute vascular toxicity. *The Oncologist* 2012;**17**:1386–1393.
- Bertone-Johnson ER, Manson JE, Purdue-Smithe AC, Steiner AZ, Eliassen AH, Hankinson SE, Rosner BA, Whitcomb BW. Anti-Müllerian hormone levels and incidence of early natural menopause in a prospective study. *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;
- Bézar J, Vigier B, Tran D, Mauléon P, Josso N. Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. *J Reprod Fertil* 1987;**80**:509–516.
- Blakely LJ, Buzdar AU, Lozada JA, Shullaih SA, Hoy E, Smith TL, Hortobagyi GN. Effects of pregnancy after treatment for breast carcinoma on survival and risk of recurrence. *Cancer* 2004;**100**:465–469.
- Bouilly J, Bachelot A, Broutin I, Touraine P, Binart N. Novel NOBOX loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Hum Mutat* 2011;**32**:1108–1113.

Références bibliographiques

- Bouilly J, Roucher-Boulez F, Gompel A, Bry-Gauillard H, Azibi K, Beldjord C, Dodé C, Bouligand J, Mantel AG, Hécart A-C, *et al.* New NOBOX mutations identified in a large cohort of women with primary ovarian insufficiency decrease KIT-L expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;**100**:994–1001.
- Bouilly J, Veitia RA, Binart N. NOBOX is a key FOXL2 partner involved in ovarian folliculogenesis. *J Mol Cell Biol* 2014;**6**:175–177.
- Braem MGM, Voorhuis M, Schouw YT van der, Peeters PHM, Schouten LJ, Eijkemans MJC, Broekmans FJ, Onland-Moret NC. Interactions between genetic variants in AMH and AMHR2 may modify age at natural menopause. *PloS One* 2013;**8**:e59819.
- Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev* 2009;**30**:465–493.
- Broer SL, Broekmans FJM, Laven JSE, Fauser BCJM. Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Hum Reprod Update* 2014;**20**:688–701.
- Broer SL, Disseldorp J van, Broeze KA, Dolleman M, Opmeer BC, Bossuyt P, Eijkemans MJC, Mol B-WJ, Broekmans FJM, IMPORT study group. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. *Hum Reprod Update* 2013;**19**:26–36.
- Bry-Gauillard H, Larrat-Ledoux F, Levailant J-M, Massin N, Maione L, Beau I, Binart N, Chanson P, Brailly-Tabard S, Hall JE, *et al.* Anti-Müllerian hormone and ovarian morphology in women with isolated hypogonadotropic hypogonadism/Kallmann syndrome. Effects of recombinant human FSH. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;
- Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM, Albertini DF. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev Biol* 1998;**204**:373–384.

Références bibliographiques

- Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen APN, Hovatta O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod Oxf Engl* 2006;**21**:2223–2227.
- Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 2003;**301**:215–218.
- Chang EM, Lim E, Yoon S, Jeong K, Bae S, Lee DR, Yoon TK, Choi Y, Lee WS. Cisplatin Induces Overactivation of the Dormant Primordial Follicle through PTEN/AKT/FOXO3a Pathway which Leads to Loss of Ovarian Reserve in Mice. *PloS One* 2015;**10**:e0144245.
- Chang H-M, Qiao J, Leung PCK. Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary-novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Hum Reprod Update* 2016;**23**:1–18.
- Chassot A-A, Gillot I, Chaboissier M-C. R-spondin1, WNT4, and the CTNNB1 signaling pathway: strict control over ovarian differentiation. *Reprod Camb Engl* 2014;**148**:R97-110.
- Checa Vizcaíno MA, Corchado AR, Cuadri MESI, Comadran MG, Brassesco M, Carreras R. The effects of letrozole on ovarian stimulation for fertility preservation in cancer-affected women. *Reprod Biomed Online* 2012;**24**:606–610.
- Chen X-Y, Xia H-X, Guan H-Y, Li B, Zhang W. Follicle Loss and Apoptosis in Cyclophosphamide-Treated Mice: What's the Matter? *Int J Mol Sci* 2016;**17**..
- Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E, Pepling ME. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology* 2007;**148**:3580–3590.
- Choi Y, Ballow DJ, Xin Y, Rajkovic A. Lim homeobox gene, *lhx8*, is essential for mouse oocyte differentiation and survival. *Biol Reprod* 2008;**79**:442–449.
- Cimino I, Casoni F, Liu X, Messina A, Parkash J, Jamin SP, Catteau-Jonard S, Collier F, Baroncini M, Dewailly D, *et al.* Novel role for anti-Müllerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. *Nat Commun* 2016;**7**:10055.

Références bibliographiques

- Clemente N di, Ghaffari S, Pepinsky RB, Pieau C, Josso N, Cate RL, Vigier B. A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-müllerian hormone: the fetal ovary aromatase assay. *Dev Camb Engl* 1992;**114**:721–727.
- Cobo A, García-Velasco JA, Coello A, Domingo J, Pellicer A, Remohí J. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril* 2016;**105**:755-764.e8.
- Conti M. Signaling networks in somatic cells and oocytes activated during ovulation. *Ann Endocrinol* 2010;**71**:189–190.
- Conti M, Hsieh M, Park J-Y, Su Y-Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2006;**20**:715–723.
- Creux H, Monnier P, Son W-Y, Buckett W. Thirteen years' experience in fertility preservation for cancer patients after in vitro fertilization and in vitro maturation treatments. *J Assist Reprod Genet* 2018;
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, *et al.* The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 2001;**27**:159–166.
- Cuevas M de, Lilly MA, Spradling AC. Germline cyst formation in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 1997;**31**:405–428.
- Cushman RA, Wahl CM, Fortune JE. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles. *Hum Reprod Oxf Engl* 2002;**17**:48–54.
- D'Avila ÂM, Biolchi V, Capp E, Corleta H von E. Age, anti-müllerian hormone, antral follicles count to predict amenorrhea or oligomenorrhea after chemotherapy with cyclophosphamide. *J Ovarian Res* 2015;**8**:82.
- De Vos M, Devroey P, Fauser BCJM. Primary ovarian insufficiency. *Lancet Lond Engl* 2010;**376**:911–921.

Références bibliographiques

- Demeestere I, Brice P, Peccatori FA, Kentos A, Dupuis J, Zachee P, Casasnovas O, Van Den Neste E, Dechene J, De Maertelaer V, *et al.* 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. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2016;**34**:2568–2574.
- Demeestere I, Simon P, Dedeken L, Moffa F, Tsépélidis S, Brachet C, Delbaere A, Devreker F, Ferster A. Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood. *Hum Reprod Oxf Engl* 2015;**30**:2107–2109.
- Detti L, Uhlmann RA, Zhang J, Diamond MP, Saed GM, Fletcher NM, Lu M, Williams LJ. Goserelin fosters bone elongation but does not prevent ovarian damage in cyclophosphamide-treated prepubertal mice. *Fertil Steril* 2014;**101**:1157-1164.e1.
- Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, Griesinger G, Kelsey TW, La Marca A, Lambalk C, *et al.* The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum Reprod Update* 2014;**20**:370–385.
- Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, Duhamel A, Catteau-Jonard S. Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod Oxf Engl* 2011;**26**:3123–3129.
- Dewailly D, Robin G, Peigne M, Decanter C, Pigny P, Catteau-Jonard S. Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Hum Reprod Update* 2016;**22**:709–724.
- Dezellus A, Barriere P, Campone M, Lemanski C, Vanlemmens L, Mignot L, Delozier T, Levy C, Bendavid C, Debled M, *et al.* Prospective evaluation of serum anti-Müllerian hormone dynamics in 250 women of reproductive age treated with chemotherapy for breast cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2017;**79**:72–80.

Références bibliographiques

- Donahoe PK, Clarke T, Teixeira J, Maheswaran S, MacLaughlin DT. Enhanced purification and production of Müllerian inhibiting substance for therapeutic applications. *Mol Cell Endocrinol* 2003;**211**:37–42.
- Donnez J, Dolmans M-M. 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**:1167–1170.
- Donnez J, Dolmans M-M. Fertility Preservation in Women. *N Engl J Med* 2017;**377**:1657–1665.
- Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, Langendonck A van. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet Lond Engl* 2004;**364**:1405–1410.
- Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck A, Demylle D, Dolmans M-M. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update* 2006;**12**:519–535.
- Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev Reprod* 2000;**5**:143–152.
- Dunlop CE, Anderson RA. Uses of anti-Müllerian hormone (AMH) measurement before and after cancer treatment in women. *Maturitas* 2015;**80**:245–250.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, Jong FH de, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, *et al.* Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001;**142**:4891–4899.
- Durlinger AL, Kramer P, Karels B, Jong FH de, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999;**140**:5789–5796.
- Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JTJ, Grootegoed JA, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002a;**143**:1076–1084.

Références bibliographiques

- Durlinger ALL, Visser JA, Themmen APN. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reprod Camb Engl* 2002b;**124**:601–609.
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 2009;**30**:624–712.
- Elzaiat M, Todeschini A-L, Caburet S, Veitia RA. The genetic make-up of ovarian development and function: the focus on the transcription factor FOXL2. *Clin Genet* 2017;**91**:173–182.
- Ethics Committee of American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation and reproduction in patients facing gonadotoxic therapies: a committee opinion. *Fertil Steril* 2013;**100**:1224–1231.
- Ezzati MM, Baker MD, Saatcioglu HD, Aloisio GM, Pena CG, Nakada Y, Cuevas I, Carr BR, Castrillon DH. Regulation of FOXO3 subcellular localization by Kit ligand in the neonatal mouse ovary. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32**:1741–1747.
- 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. *Hum Reprod Oxf Engl* 1993;**8**:2080–2087.
- Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod Oxf Engl* 2003;**18**:323–327.
- Feng C-W, Bowles J, Koopman P. Control of mammalian germ cell entry into meiosis. *Mol Cell Endocrinol* 2014;**382**:488–497.
- Fisch B, Abir R. Female fertility preservation: past, present and future. *Reprod Camb Engl* 2018;
- Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, *et al.* Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 2000;**25**:279–283.

Références bibliographiques

- Gavish Z, Peer G, Roness H, Cohen Y, Meirow D. Follicle activation and “burn-out” contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness. *Hum Reprod Oxf Engl* 2015;**30**:1003.
- Gavish Z, Spector I, Peer G, Schlatt S, Wistuba J, Roness H, Meirow D. Follicle activation is a significant and immediate cause of follicle loss after ovarian tissue transplantation. *J Assist Reprod Genet* 2018;**35**:61–69.
- Gawriluk TR, Hale AN, Flaws JA, Dillon CP, Green DR, Rucker EB. Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary. *Reprod Camb Engl* 2011;**141**:759–765.
- Gerstl B, Sullivan E, Ives A, Saunders C, Wand H, Anazodo A. Pregnancy Outcomes After a Breast Cancer Diagnosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Breast Cancer* 2018;**18**:e79–e88.
- Ghafari F, Gutierrez CG, Hartshorne GM. Apoptosis in mouse fetal and neonatal oocytes during meiotic prophase one. *BMC Dev Biol* 2007;**7**:87.
- Gigli I, Cushman RA, Wahl CM, Fortune JE. Evidence for a role for anti-Mullerian hormone in the suppression of follicle activation in mouse ovaries and bovine ovarian cortex grafted beneath the chick chorioallantoic membrane. *Mol Reprod Dev* 2005;**71**:480–488.
- Goldman KN, Chenette D, Arju R, Duncan FE, Keefe DL, Grifo JA, Schneider RJ. mTORC1/2 inhibition preserves ovarian function and fertility during genotoxic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017a;**114**:3186–3191.
- Goldman RH, Racowsky C, Farland LV, Munné S, Ribustello L, Fox JH. Predicting the likelihood of live birth for elective oocyte cryopreservation: a counseling tool for physicians and patients. *Hum Reprod Oxf Engl* 2017b;**32**:853–859.
- Gonfloni S, Di Tella L, Caldarola S, Cannata SM, Klinger FG, Di Bartolomeo C, Mattei M, Candi E, De Felici M, Melino G, *et al.* Inhibition of the c-Abl-TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death. *Nat Med* 2009;**15**:1179–1185.

Références bibliographiques

- Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;**17**:121–155.
- Gougeon A. Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Ann Endocrinol* 2010;**71**:132–143.
- Gremeau A-S, Andreadis N, Fatum M, Craig J, Turner K, McVeigh E, Child T. In vitro maturation or in vitro fertilization for women with polycystic ovaries? A case-control study of 194 treatment cycles. *Fertil Steril* 2012;**98**:355–360.
- Grive KJ, Freiman RN. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Dev Camb Engl* 2015;**142**:2554–2563.
- Grøndahl ML, Nielsen ME, Dal Canto MB, Fadini R, Rasmussen IA, Westergaard LG, Kristensen SG, Yding Andersen C. Anti-Müllerian hormone remains highly expressed in human cumulus cells during the final stages of folliculogenesis. *Reprod Biomed Online* 2011;**22**:389–398.
- Grossman MP, Nakajima ST, Fallat ME, Siow Y. Müllerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. *Fertil Steril* 2008;**89**:1364–1370.
- Grynberg M, El Hachem H, Bantel A de, Benard J, Parco S le, Fanchin R. In vitro maturation of oocytes: uncommon indications. *Fertil Steril* 2013;**99**:1182–1188.
- Grynberg M, Pierre A, Rey R, Leclerc A, Arouche N, Hesters L, Catteau-Jonard S, Frydman R, Picard J-Y, Fanchin R, *et al.* Differential regulation of ovarian anti-müllerian hormone (AMH) by estradiol through α - and β -estrogen receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;**97**:E1649-1657.
- Guéripel X, Brun V, Gougeon A. Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus expansion. *Biol Reprod* 2006;**75**:836–843.

Références bibliographiques

- Guigon CJ, Magre S. Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biol Reprod* 2006;**74**:450–458.
- Hagen CP, Sørensen K, Anderson RA, Juul A. Serum levels of antimüllerian hormone in early maturing girls before, during, and after suppression with GnRH agonist. *Fertil Steril* 2012;**98**:1326–1330.
- Hamy A-S, Porcher R, Cuvier C, Giacchetti S, Schlageter M-H, Coussieu C, Gronier H, Feugeas J-P, Adoui N, Lacorte J-M, *et al.* Ovarian reserve in breast cancer: assessment with anti-Müllerian hormone. *Reprod Biomed Online* 2014;**29**:573–580.
- Hamy A-S, Porcher R, Eskenazi S, Cuvier C, Giacchetti S, Coussy F, Hocini H, Tournant B, Perret F, Bonfils S, *et al.* Anti-Müllerian hormone in breast cancer patients treated with chemotherapy: a retrospective evaluation of subsequent pregnancies. *Reprod Biomed Online* 2016;**32**:299–307.
- Hancke K, Strauch O, Kissel C, Göbel H, Schäfer W, Denschlag D. Sphingosine 1-phosphate protects ovaries from chemotherapy-induced damage in vivo. *Fertil Steril* 2007;**87**:172–177.
- Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N, Craig LB. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertil Steril* 2011;**95**:170–175.
- Hasky N, Uri-Belapolsky S, Goldberg K, Miller I, Grossman H, Stemmer SM, Ben-Aharon I, Shalgi R. Gonadotrophin-releasing hormone agonists for fertility preservation: unraveling the enigma? *Hum Reprod Oxf Engl* 2015;**30**:1089–1101.
- Hassanpour A, Yousefian S, Askaripour M, Sharififar F, Ezzatabadipour M. Ovarian protection in cyclophosphamide-treated mice by fennel. *Toxicol Rep* 2017;**4**:160–164.
- Hayes E, Kushnir V, Ma X, Biswas A, Prizant H, Gleicher N, Sen A. Intra-cellular mechanism of Anti-Müllerian hormone (AMH) in regulation of follicular development. *Mol Cell Endocrinol* 2016;**433**:56–65.
- Hillier SG, Reichert LE, Van Hall EV. Control of preovulatory follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;**52**:847–856.

Références bibliographiques

- Himmelstein-Braw R, Peters H, Faber M. Morphological study of the ovaries of leukaemic children. *Br J Cancer* 1978;**38**:82–87.
- Hirobe S, He WW, Gustafson ML, MacLaughlin DT, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance gene expression in the cycling rat ovary correlates with recruited or graafian follicle selection. *Biol Reprod* 1994;**50**:1238–1243.
- Hirobe S, He WW, Lee MM, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology* 1992;**131**:854–862.
- Horicks F, Van Den Steen G, Gervy C, Clarke HJ, Demeestere I. Both in vivo FSH depletion and follicular exposure to Gonadotrophin-releasing hormone analogues in vitro are not effective to prevent follicular depletion during chemotherapy in mice. *Mol Hum Reprod* 2018;
- Hu R, Wang F, Yu L, Luo Y, Wu X, Li J, Zhang X, Oehninger S, Bocca S. Antimüllerian hormone regulates stem cell factor expression in human granulosa cells. *Fertil Steril* 2014;**102**:1742-1750.e1.
- Iino K, Kaori I, Tarakida A, Ayako T, Abe K, Kazuhiro A, Taniguchi R, Ryosuke T, Higuchi T, Tsuyoshi H, *et al.* Role of antimüllerian hormone as a biomarker of the menopausal transition. *Menopause N Y N* 2013;**20**:218–222.
- Iwase A, Nakamura T, Osuka S, Takikawa S, Goto M, Kikkawa F. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve: What have we learned, and what should we know? *Reprod Med Biol* 2016;**15**:127–136.
- Iwase A, Osuka S, Goto M, Murase T, Nakamura T, Takikawa S, Kikkawa F. Clinical application of serum anti-Müllerian hormone as an ovarian reserve marker: A review of recent studies. *J Obstet Gynaecol Res* 2018;

Références bibliographiques

- Jagarlamudi K, Liu L, Adhikari D, Reddy P, Idahl A, Ottander U, Lundin E, Liu K. Oocyte-specific deletion of Pten in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation. *PLoS One* 2009;**4**:e6186.
- Jang H, Lee O-H, Lee Y, Yoon H, Chang EM, Park M, Lee J-W, Hong K, Kim JO, Kim NK, *et al.* Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary. *J Pineal Res* 2016;**60**:336–347.
- Jang H, Na Y, Hong K, Lee S, Moon S, Cho M, Park M, Lee O-H, Chang EM, Lee DR, *et al.* Synergistic effect of melatonin and ghrelin in preventing cisplatin-induced ovarian damage via regulation of FOXO3a phosphorylation and binding to the p27Kip1 promoter in primordial follicles. *J Pineal Res* 2017;**63**.
- Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG, Jayaprakasan K, Rainey-Fenning N, Campbell BK, Yding Andersen C. Which follicles make the most anti-Müllerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection. *Mol Hum Reprod* 2013;**19**:519–527.
- John GB, Gallardo TD, Shirley LJ, Castrillon DH. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Dev Biol* 2008;**321**:197–204.
- Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee H-J, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R, *et al.* Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 2005;**122**:303–315.
- Josso N. Professor Alfred Jost: the builder of modern sex differentiation. *Sex Dev Genet Mol Biol Evol Endocrinol Embryol Pathol Sex Determ Differ* 2008;**2**:55–63.
- Josso N, di Clemente N, Gouédard L. Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2001;**179**:25–32.
- Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S, Wolf I, Kanety H, Sredni B, Meirov D. Cyclophosphamide triggers follicle activation and “burnout”; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Sci Transl Med* 2013;**5**:185ra62.

Références bibliographiques

- Kano M, Sosulski AE, Zhang L, Saatcioglu HD, Wang D, Nagykerly N, Sabatini ME, Gao G, Donahoe PK, Pépin D. AMH/MIS as a contraceptive that protects the ovarian reserve during chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;**114**:E1688–E1697.
- Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho C, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S, *et al.* Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;**110**:17474–17479.
- Kaya H, Desdicioglu R, Sezik M, Ulukaya E, Ozkaya O, Yilmaztepe A, Demirci M. Does sphingosine-1-phosphate have a protective effect on cyclophosphamide- and irradiation-induced ovarian damage in the rat model? *Fertil Steril* 2008;**89**:732–735.
- Kelsey TW, Wright P, Nelson SM, Anderson RA, Wallace WHB. A validated model of serum anti-müllerian hormone from conception to menopause. *PloS One* 2011;**6**:e22024.
- Kerr JB, Hutt KJ, Michalak EM, Cook M, Vandenberg CJ, Liew SH, Bouillet P, Mills A, Scott CL, Findlay JK, *et al.* DNA damage-induced primordial follicle oocyte apoptosis and loss of fertility require TAp63-mediated induction of Puma and Noxa. *Mol Cell* 2012;**48**:343–352.
- Kersual N, Garambois V, Chardès T, Pouget J-P, Salhi I, Bascoul-Mollevi C, Bibeau F, Busson M, Vié H, Clémenceau B, *et al.* The human Müllerian inhibiting substance type II receptor as immunotherapy target for ovarian cancer. Validation using the mAb 12G4. *mAbs* 2014;**6**:1314–1326.
- Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, Lang-Born BMN van de, Jong FH de, Groome NP, Themmen APN, Visser JA. Serum anti-müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* 2006;**147**:3228–3234.
- Kezele P, Skinner MK. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology* 2003;**144**:3329–3337.

Références bibliographiques

- Kim J, Turan V, Oktay K. Long-Term Safety of Letrozole and Gonadotropin Stimulation for Fertility Preservation in Women With Breast Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;**101**:1364–1371.
- Kim JH, MacLaughlin DT, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone: A novel treatment for gynecologic tumors. *Obstet Gynecol Sci* 2014;**57**:343–357.
- Kim S-Y, Cordeiro MH, Serna VA, Ebbert K, Butler LM, Sinha S, Mills AA, Woodruff TK, Kurita T. Rescue of platinum-damaged oocytes from programmed cell death through inactivation of the p53 family signaling network. *Cell Death Differ* 2013;**20**:987–997.
- Kishk EAF, Mohammed Ali MH. Effect of a gonadotropin-releasing hormone analogue on cyclophosphamide-induced ovarian toxicity in adult mice. *Arch Gynecol Obstet* 2013;**287**:1023–1029.
- Kitajima M, Dolmans M-M, Donnez O, Masuzaki H, Soares M, Donnez J. Enhanced follicular recruitment and atresia in cortex derived from ovaries with endometriomas. *Fertil Steril* 2014;**101**:1031–1037.
- Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reprod Camb Engl* 2006;**132**:191–206.
- Kong HS, Kim SK, Lee J, Youm HW, Lee JR, Suh CS, Kim SH. Effect of Exogenous Anti-Müllerian Hormone Treatment on Cryopreserved and Transplanted Mouse Ovaries. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif* 2016;**23**:51–60.
- Kujjo LL, Laine T, Pereira RJG, Kagawa W, Kurumizaka H, Yokoyama S, Perez GI. Enhancing survival of mouse oocytes following chemotherapy or aging by targeting Bax and Rad51. *PloS One* 2010;**5**:e9204.
- Kushnir VA, Seifer DB, Barad DH, Sen A, Gleicher N. Potential therapeutic applications of human anti-Müllerian hormone (AMH) analogues in reproductive medicine. *J Assist Reprod Genet* 2017;**34**:1105–1113.

Références bibliographiques

- La Marca A, Ferraretti AP, Palermo R, Ubaldi FM. The use of ovarian reserve markers in IVF clinical practice: a national consensus. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol* 2016;**32**:1–5.
- La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update* 2014;**20**:124–140.
- La Marca A, Volpe A. The Anti-Müllerian hormone and ovarian cancer. *Hum Reprod Update* 2007;**13**:265–273.
- Lambertini M, Del Mastro L, Pescio MC, Andersen CY, Azim HA, Peccatori FA, Costa M, Revelli A, Salvagno F, Gennari A, *et al.* Cancer and fertility preservation: international recommendations from an expert meeting. *BMC Med* 2016;**14**:1.
- Lan K-C, Chang SY, Huang F-J, Lin H-J, Lin C-Y, Huang K-E, Kang H-Y. Analysis of androgen receptor and anti-Müllerian hormone pathways in human granulosa cells under luteinizing hormone treatment. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2013;**11**:11.
- Lande Y, Fisch B, Tsur A, Farhi J, Prag-Rosenberg R, Ben-Haroush A, Kessler-Icekson G, Zahalka MA, Ludeman SM, Abir R. Short-term exposure of human ovarian follicles to cyclophosphamide metabolites seems to promote follicular activation in vitro. *Reprod Biomed Online* 2017;**34**:104–114.
- Lee H, Grosse R, Ranganath R, Ng AY. Unsupervised learning of hierarchical representations with convolutional deep belief networks. *Commun ACM* 2011;**54**:95–103.
- Li F, Turan V, Lierman S, Cuvelier C, De Sutter P, Oktay K. Sphingosine-1-phosphate prevents chemotherapy-induced human primordial follicle death. *Hum Reprod Oxf Engl* 2014;**29**:107–113.
- Li HWR, Anderson RA, Yeung WSB, Ho PC, Ng EHY. Evaluation of serum antimüllerian hormone and inhibin B concentrations in the differential diagnosis of secondary oligoamenorrhea. *Fertil Steril* 2011;**96**:774–779.

Références bibliographiques

- Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, Duan E-K, Hsueh AJW. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:10280–10284.
- Li L, Zhou X, Wang X, Wang J, Zhang W, Wang B, Cao Y, Kee K. A dominant negative mutation at the ATP binding domain of AMHR2 is associated with a defective anti-Müllerian hormone signaling pathway. *Mol Hum Reprod* 2016;**22**:669–678.
- Liu C, Peng J, Matzuk MM, Yao HH-C. Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. *Nat Commun* 2015;**6**:6934.
- Liu H-Z, Tao Y-X, Luo P, Deng C-M, Gu Y-P, Yang L, Zhong J-P. Preventive Effects of a Novel Polysaccharide from *Sepia esculenta* Ink on Ovarian Failure and Its Action Mechanisms in Cyclophosphamide-Treated Mice. *J Agric Food Chem* 2016;**64**:5759–5766.
- Lyttle Schumacher B, Grover N, Mesen T, Steiner A, Mersereau J. Modeling of live-birth rates and cost-effectiveness of oocyte cryopreservation for cancer patients prior to high- and low-risk gonadotoxic chemotherapy. *Hum Reprod Oxf Engl* 2017;**32**:2049–2055.
- Maiani E, Di Bartolomeo C, Klinger FG, Cannata SM, Bernardini S, Chateauvieux S, Mack F, Mattei M, De Felici M, Diederich M, *et al.* Reply to: Cisplatin-induced primordial follicle oocyte killing and loss of fertility are not prevented by imatinib. *Nat Med* 2012;**18**:1172–1174.
- Maiani E, Diederich M, Gonfloni S. DNA damage response: the emerging role of c-Abl as a regulatory switch? *Biochem Pharmacol* 2011;**82**:1269–1276.
- Margolskee A, Selgrade JF. A lifelong model for the female reproductive cycle with an antimüllerian hormone treatment to delay menopause. *J Theor Biol* 2013;**326**:21–35.
- Martinez F, International Society for Fertility Preservation–ESHRE–ASRM Expert Working Group. Update on fertility preservation from the Barcelona International Society for Fertility Preservation-ESHRE-ASRM 2015 expert meeting: indications, results and future perspectives. *Fertil Steril* 2017;**108**:407-415.e11.

Références bibliographiques

- Martinez-Royo A, Jurado JJ, Smulders JP, Martí JJ, Alabart JL, Roche A, Fantova E, Bodin L, Mulsant P, Serrano M, *et al.* A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Anim Genet* 2008;**39**:294–297.
- Masiakos PT, MacLaughlin DT, Maheswaran S, Teixeira J, Fuller AF, Shah PC, Kehas DJ, Kenneally MK, Dombkowski DM, Ha TU, *et al.* Human ovarian cancer, cell lines, and primary ascites cells express the human Mullerian inhibiting substance (MIS) type II receptor, bind, and are responsive to MIS. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 1999;**5**:3488–3499.
- Massagué J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 2000;**14**:627–644.
- Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 2002;**296**:2178–2180.
- McGee EA, Raj RS. Regulators of ovarian preantral follicle development. *Semin Reprod Med* 2015;**33**:179–184.
- 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. *Mol Hum Reprod* 2014;**20**:736–744.
- McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, *et al.* Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reprod Camb Engl* 2005;**129**:473–480.
- Meduri G, Charnaux N, Spyrtatos F, Hacene K, Loosfelt H, Milgrom E. Luteinizing hormone receptor status and clinical, pathologic, and prognostic features in patients with breast carcinomas. *Cancer* 2003;**97**:1810–1816.
- Meirow D, Assad G, Dor J, Rabinovici J. The GnRH antagonist cetrorelix reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice. *Hum Reprod Oxf Engl* 2004;**19**:1294–1299.

Références bibliographiques

- Meirow D, Dor J, Kaufman B, Shrim A, Rabinovici J, Schiff E, Raanani H, Levron J, Fridman E. Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum Reprod Oxf Engl* 2007;**22**:1626–1633.
- Meirow D, Lewis H, Nugent D, Epstein M. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. *Hum Reprod Oxf Engl* 1999;**14**:1903–1907.
- Meirow D, Roness H, Kristensen SG, Andersen CY. Optimizing outcomes from ovarian tissue cryopreservation and transplantation; activation versus preservation. *Hum Reprod Oxf Engl* 2015;**30**:2453–2456.
- Merhi Z, Irani M, Doswell AD, Ambroggio J. Follicular Fluid Soluble Receptor for Advanced Glycation End-Products (sRAGE): A Potential Indicator of Ovarian Reserve. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;jc20133839.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;**27**:107–132.
- Monget P, Bondy C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2000;**163**:89–93.
- Monniaux D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology* 2016;**86**:41–53.
- Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, Monget P. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? *Biol Reprod* 2014;**90**:85.
- Moore HCF, Unger JM, Phillips K-A, Boyle F, Hitre E, Porter D, Francis PA, Goldstein LJ, Gomez HL, Vallejos CS, *et al.* Goserelin for ovarian protection during breast-cancer adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2015;**372**:923–932.
- Morel Y, Roucher F, Mallet D, Plotton I. Genetic of gonadal determination. *Ann Endocrinol* 2014;**75**:32–39.

Références bibliographiques

- Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod Update* 2012;**18**:525–535.
- 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**:e70117.
- Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Callebaut I, *et al.* Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérino ewes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:5104–5109.
- Munster PN, Moore AP, Ismail-Khan R, Cox CE, Lacey M, Gross-King M, Xu P, Carter WB, Minton SE. Randomized trial using gonadotropin-releasing hormone agonist triptorelin for the preservation of ovarian function during (neo)adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2012;**30**:533–538.
- Myers M, Britt KL, Wreford NGM, Ebling FJP, Kerr JB. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reprod Camb Engl* 2004;**127**:569–580.
- Nicol L, Bishop SC, Pong-Wong R, Bendixen C, Holm L-E, Rhind SM, McNeilly AS. Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Reprod Camb Engl* 2009;**138**:921–933.
- Nilsson E, Rogers N, Skinner MK. Actions of anti-Mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reprod Camb Engl* 2007;**134**:209–221.
- Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet Lond Engl* 2007;**370**:685–697.
- Ogura-Nose S, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Hiroi H, Yano T, Taketani Y. Anti-Mullerian hormone (AMH) is induced by bone morphogenetic protein (BMP) cytokines in human granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;**164**:44–47.

Références bibliographiques

- Oktaý K, Taylan E, Rodriguez-Wallberg KA, Bedoschi G, Turan V, Pacheco F. Goserelin Does Not Preserve Ovarian Function Against Chemotherapy-Induced Damage. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2017;
- Oktem O, Oktaý K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. *Cancer Res* 2007;**67**:10159–10162.
- Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 2000;**275**:39523–39528.
- Oven Ustaalioglu BB, Bilici A, Kefeli U, Seker M, Salepci T, Unal O, Gumus M. A retrospective analysis of women's chances to become pregnant after completion of chemotherapy: a single center experience. *J BUON Off J Balk Union Oncol* 2011;**16**:349–352.
- Pache TD, Wladimiroff JW, Jong FH de, Hop WC, Fauser BC. Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 1990;**54**:638–642.
- Pacheco A, Cruz M, García Velasco JA. Impact of very low anti-Müllerian hormone on pregnancy success. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2017;**29**:131–135.
- Pangas SA. Regulation of the ovarian reserve by members of the transforming growth factor beta family. *Mol Reprod Dev* 2012;**79**:666–679.
- Pangas SA, Choi Y, Ballow DJ, Zhao Y, Westphal H, Matzuk MM, Rajkovic A. Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:8090–8095.
- Pannetier M, Chassot A-A, Chaboissier M-C, Pailhoux E. Involvement of *FOXL2* and *RSP01* in Ovarian Determination, Development, and Maintenance in Mammals. *Sex Dev Genet Mol Biol Evol Endocrinol Embryol Pathol Sex Determ Differ* 2016;**10**:167–184.
- Papaleo E, Zaffagnini S, Munaretto M, Vanni VS, Rebonato G, Grisendi V, Di Paola R, La Marca A. Clinical application of a nomogram based on age, serum FSH and AMH to select the FSH starting dose in IVF/ICSI cycles: a retrospective two-centres study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2016;**207**:94–99.

Références bibliographiques

- Paredes A, Garcia-Rudaz C, Kerr B, Tapia V, Dissen GA, Costa ME, Cornea A, Ojeda SR. Loss of synaptonemal complex protein-1, a synaptonemal complex protein, contributes to the initiation of follicular assembly in the developing rat ovary. *Endocrinology* 2005;**146**:5267–5277.
- Park J-Y, Su Y-Q, Ariga M, Law E, Jin S-LC, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 2004;**303**:682–684.
- Pascuali N, Scotti L, Di Pietro M, Oubiña G, Bas D, May M, Gómez Muñoz A, Cuasnicú PS, Cohen DJ, Tesone M, *et al.* Ceramide-1-phosphate has protective properties against cyclophosphamide-induced ovarian damage in a mice model of premature ovarian failure. *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;
- Pedersen T. Determination of follicle growth rate in the ovary of the immature mouse. *J Reprod Fertil* 1970;**21**:81–93.
- Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil* 1968;**17**:555–557.
- Peigné M, Decanter C. Serum AMH level as a marker of acute and long-term effects of chemotherapy on the ovarian follicular content: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2014;**12**:26.
- Pelosi E, Omari S, Michel M, Ding J, Amano T, Forabosco A, Schlessinger D, Ottolenghi C. Constitutively active Foxo3 in oocytes preserves ovarian reserve in mice. *Nat Commun* 2013;**4**:1843.
- Pepling ME. Follicular assembly: mechanisms of action. *Reprod Camb Engl* 2012;**143**:139–149.
- Pepling ME, Spradling AC. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol* 2001;**234**:339–351.
- Pereira N, Hancock K, Cordeiro CN, Lekovich JP, Schattman GL, Rosenwaks Z. Comparison of ovarian stimulation response in patients with breast cancer undergoing ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins to patients undergoing ovarian stimulation

Références bibliographiques

- with gonadotropins alone for elective cryopreservation of oocytes†. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol* 2016;**32**:823–826.
- Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, Cacciatore C, Fabre S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum Reprod Update* 2014;**20**:869–883.
- Piasecka-Srader J, Blanco FF, Delman DH, Dixon DA, Geiser JL, Ciereszko RE, Petroff BK. Tamoxifen prevents apoptosis and follicle loss from cyclophosphamide in cultured rat ovaries. *Biol Reprod* 2015;**92**:132.
- Pierre A, Estienne A, Racine C, Picard J-Y, Fanchin R, Lahoz B, Alabart JL, Folch J, Jarrier P, Fabre S, *et al.* The Bone Morphogenetic Protein 15 Up-Regulates the Anti-Müllerian Hormone Receptor Expression in Granulosa Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;**101**:2602–2611.
- Pierre A, Peigné M, Grynberg M, Arouche N, Taieb J, Hesters L, Gonzalès J, Picard J-Y, Dewailly D, Fanchin R, *et al.* Loss of LH-induced down-regulation of anti-Müllerian hormone receptor expression may contribute to anovulation in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Oxf Engl* 2013;**28**:762–769.
- Pierre A, Taieb J, Giton F, Grynberg M, Touleimat S, El Hachem H, Fanchin R, Monniaux D, Cohen-Tannoudji J, Clemente N di, *et al.* Dysregulation of the Anti-Müllerian Hormone System by Steroids in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;**102**:3970–3978.
- Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Serum anti-Müllerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:941–945.
- Poirot C, Abirached F, Prades M, Coussieu C, Bernaudin F, Piver P. Induction of puberty by autograft of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet Lond Engl* 2012;**379**:588.

Références bibliographiques

- Poole DH, Ocón-Grove OM, Johnson AL. Anti-Müllerian hormone (AMH) receptor type II expression and AMH activity in bovine granulosa cells. *Theriogenology* 2016;**86**:1353–1360.
- Prasath EB, Chan MLH, Wong WHW, Lim CJW, Tharmalingam MD, Hendricks M, Loh SF, Chia YN. First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from in vitro matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient. *Hum Reprod Oxf Engl* 2014;**29**:276–278.
- Qin Y, Jiao X, Dagleish R, Vujovic S, Li J, Simpson JL, Al-Azzawi F, Chen Z-J. Novel variants in the SOHLH2 gene are implicated in human premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2014;**101**:1104-1109.e6.
- Quinn MM, Kao C-N, Ahmad AK, Haisenleder DJ, Santoro N, Eisenberg E, Legro RS, Cedars MI, Huddleston HG, NIH/NICHD Reproductive Medicine Network. Age-stratified thresholds of anti-Müllerian hormone improve prediction of polycystic ovary syndrome over a population-based threshold. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2017;**87**:733–740.
- Rajareddy S, Reddy P, Du C, Liu L, Jagarlamudi K, Tang W, Shen Y, Berthet C, Peng SL, Kaldis P, *et al.* p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2007;**21**:2189–2202.
- Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 2004;**305**:1157–1159.
- Rapport_synthese_France_IA_.pdf Available from:
https://www.economie.gouv.fr/files/files/PDF/2017/Rapport_synthese_France_IA_.pdf.
- Reddy P, Adhikari D, Zheng W, Liang S, Hämäläinen T, Tohonen V, Ogawa W, Noda T, Volarevic S, Huhtaniemi I, *et al.* PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Hum Mol Genet* 2009;**18**:2813–2824.

Références bibliographiques

- Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hämäläinen T, Peng SL, *et al.* Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 2008;**319**:611–613.
- Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol Metab TEM* 2010;**21**:96–103.
- Renaud EJ, MacLaughlin DT, Oliva E, Rueda BR, Donahoe PK. Endometrial cancer is a receptor-mediated target for Mullerian Inhibiting Substance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:111–116.
- Rice S, Ojha K, Whitehead S, Mason H. Stage-specific expression of androgen receptor, follicle-stimulating hormone receptor, and anti-Müllerian hormone type II receptor in single, isolated, human preantral follicles: relevance to polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**:1034–1040.
- Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest* 2010;**120**:963–972.
- Roness H, Kashi O, Meirow D. Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage. *Fertil Steril* 2016;**105**:20–29.
- Rossi V, Lispi M, Longobardi S, Mattei M, Rella FD, Salustri A, De Felici M, Klinger FG. LH prevents cisplatin-induced apoptosis in oocytes and preserves female fertility in mouse. *Cell Death Differ* 2017;**24**:72–82.
- Roti Roti EC, Ringelstetter AK, Kropp J, Abbott DH, Salih SM. Bortezomib prevents acute doxorubicin ovarian insult and follicle demise, improving the fertility window and pup birth weight in mice. *PloS One* 2014;**9**:e108174.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod Oxf Engl* 2004;**19**:41–47.

Références bibliographiques

- Saleh DO, Mansour DF. Ovario-protective effects of genistein against cyclophosphamide toxicity in rats: Role of anti-müllerian hormone and oestradiol. *Eur J Pharmacol* 2016;**789**:163–171.
- Saleh HS, Omar E, Froemming GRA, Said RM. Tocotrienol preserves ovarian function in cyclophosphamide therapy. *Hum Exp Toxicol* 2015;**34**:946–952.
- Scalercio SRRA, Brito AB, Domingues SFS, Santos RR, Amorim CA. Immunolocalization of growth, inhibitory, and proliferative factors involved in initial ovarian folliculogenesis from adult common squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). *Reprod Sci Thousand Oaks Calif* 2015;**22**:68–74.
- Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier A-C, Treier M. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Dev Camb Engl* 2004;**131**:933–942.
- Schmidt KLT, Kryger-Baggesen N, Byskov AG, Andersen CY. Anti-Müllerian hormone initiates growth of human primordial follicles in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 2005;**234**:87–93.
- Schneider A, Zhi X, Moreira F, Lucia T, Mondadori RG, Masternak MM. Primordial follicle activation in the ovary of Ames dwarf mice. *J Ovarian Res* 2014;**7**:120.
- Segers I, Mateizel I, Van Moer E, Smitz J, Tournaye H, Verheyen G, De Vos M. 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. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32**:1221–1231.
- Segev DL, Hoshiya Y, Stephen AE, Hoshiya M, Tran TT, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Maheswaran S. Mullerian inhibiting substance regulates NFkappaB signaling and growth of mammary epithelial cells in vivo. *J Biol Chem* 2001;**276**:26799–26806.
- Seifer DB, Merhi Z. Is AMH a regulator of follicular atresia? *J Assist Reprod Genet* 2014;**31**:1403–1407.

Références bibliographiques

- Seroka-Vanhove A, Sonigo C, Roche C, Grynberg M. [What's new in 2014 about anti-Müllerian hormone?]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2014;**43**:559–571.
- Shandley LM, Fothergill A, Spencer JB, Mertens AC, Cottrell HN, Howards PP. Impact of cancer treatment on risk of infertility and diminished ovarian reserve in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2018;
- Shin Y-H, Ren Y, Suzuki H, Golnoski KJ, Ahn HW, Mico V, Rajkovic A. Transcription factors SOHLH1 and SOHLH2 coordinate oocyte differentiation without affecting meiosis I. *J Clin Invest* 2017;**127**:2106–2117.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018;**68**:7–30.
- Skaznik-Wikiel ME, McGuire MM, Sukhwani M, Donohue J, Chu T, Krivak TC, Rajkovic A, Orwig KE. Granulocyte colony-stimulating factor with or without stem cell factor extends time to premature ovarian insufficiency in female mice treated with alkylating chemotherapy. *Fertil Steril* 2013;**99**:2045-2054.e3.
- Soleimani R, Heytens E, Darzynkiewicz Z, Oktay K. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. *Aging* 2011;**3**:782–793.
- Song Z-H, Yu H-Y, Wang P, Mao G-K, Liu W-X, Li M-N, Wang H-N, Shang Y-L, Liu C, Xu Z-L, *et al.* Germ cell-specific Atg7 knockout results in primary ovarian insufficiency in female mice. *Cell Death Dis* 2015;**6**:e1589.
- Sonigo C, Sermondade N, Benard J, Benoit A, Shore J, Sifer C, Grynberg M. The past, present and future of fertility preservation in cancer patients. *Future Oncol Lond Engl* 2015;
- Sönmezer M, Türkçüoğlu I, Coşkun U, Oktay K. Random-start controlled ovarian hyperstimulation for emergency fertility preservation in letrozole cycles. *Fertil Steril* 2011;**95**:2125.e9-11.
- Staley K, Scharfman H. A woman's prerogative. *Nat Neurosci* 2005;**8**:697–699.

Références bibliographiques

- Steiner AZ, Pritchard D, Stanczyk FZ, Kesner JS, Meadows JW, Herring AH, Baird DD. Association Between Biomarkers of Ovarian Reserve and Infertility Among Older Women of Reproductive Age. *JAMA* 2017;**318**:1367–1376.
- Su HI, Maas K, Sluss PM, Chang RJ, Hall JE, Joffe H. The impact of depot GnRH agonist on AMH levels in healthy reproductive-aged women. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;**98**:E1961-1966.
- Sukumvanich P, Case LD, Van Zee K, Singletary SE, Paskett ED, Petrek JA, Naftalis E, Naughton MJ. Incidence and time course of bleeding after long-term amenorrhea after breast cancer treatment: a prospective study. *Cancer* 2010;**116**:3102–3111.
- Sun Y-C, Sun X-F, Dyce PW, Shen W, Chen H. The role of germ cell loss during primordial follicle assembly: a review of current advances. *Int J Biol Sci* 2017;**13**:449–457.
- Sun Y-C, Wang Y-Y, Sun X-F, Cheng S-F, Li L, Zhao Y, Shen W, Chen H. The role of autophagy during murine primordial follicle assembly. *Aging* 2018;**10**:197–211.
- Taskin MI, Yay A, Adali E, Balcioglu E, Inceboz U. Protective effects of sildenafil citrate administration on cisplatin-induced ovarian damage in rats. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol* 2015;**31**:272–277.
- Tehrani FR, Solaymani-Dodaran M, Tohidi M, Gohari MR, Azizi F. Modeling age at menopause using serum concentration of anti-mullerian hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;**98**:729–735.
- Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev* 2001;**22**:657–674.
- Teletin M, Vernet N, Ghyselinck NB, Mark M. Roles of Retinoic Acid in Germ Cell Differentiation. *Curr Top Dev Biol* 2017;**125**:191–225.
- Tham Y-L, Sexton K, Weiss H, Elledge R, Friedman LC, Kramer R. The rates of chemotherapy-induced amenorrhea in patients treated with adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide followed by a taxane. *Am J Clin Oncol* 2007a;**30**:126–132.

Références bibliographiques

- Tham Y-L, Sexton K, Weiss H, Elledge R, Friedman LC, Kramer R. The rates of chemotherapy-induced amenorrhea in patients treated with adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide followed by a taxane. *Am J Clin Oncol* 2007b;**30**:126–132.
- Tilly JL. Ovarian follicle counts--not as simple as 1, 2, 3. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2003;**1**:11.
- Ting AY, Petroff BK. Tamoxifen decreases ovarian follicular loss from experimental toxicant DMBA and chemotherapy agents cyclophosphamide and doxorubicin in the rat. *J Assist Reprod Genet* 2010;**27**:591–597.
- Tingen C, Kim A, Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod* 2009;**15**:795–803.
- Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 2004;**13**:1171–1181.
- Uzelac PS, Delaney AA, Christensen GL, Bohler HCL, Nakajima ST. Live birth following in vitro maturation of oocytes retrieved from extracorporeal ovarian tissue aspiration and embryo cryopreservation for 5 years. *Fertil Steril* 2015;**104**:1258–1260.
- Vaiarelli A, Venturella R, Vizziello D, Bulletti F, Ubaldi FM. Dual ovarian stimulation and random start in assisted reproductive technologies: from ovarian biology to clinical application. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2017;**29**:153–159.
- Van Erp AC, Hoeksma D, Rebolledo RA, Ottens PJ, Jochmans I, Monbaliu D, Pirenne J, Leuvenink HGD, Decuypere J-P. The Crosstalk between ROS and Autophagy in the Field of Transplantation Medicine. *Oxid Med Cell Longev* 2017;**2017**:7120962.
- Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J Clin Invest* 1998;**101**:2622–2629.
- Vigier B, Forest MG, Eychenne B, Bézard J, Garrigou O, Robel P, Josso N. Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;**86**:3684–3688.

Références bibliographiques

- Vigier B, Tran D, Legeai L, Bézard J, Josso N. Origin of anti-Müllerian hormone in bovine freemartin fetuses. *J Reprod Fertil* 1984;**70**:473–479.
- Vinatier D, Dufour P, Tordjeman-Rizzi N, Prolongeau JF, Depret-Moser S, Monnier JC. Immunological aspects of ovarian function: role of the cytokines. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995;**63**:155–168.
- Visser JA, de Jong FH, Laven JSE, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reprod Camb Engl* 2006;**131**:1–9.
- Visser JA, Durlinger ALL, Peters IJJ, Heuvel ER van den, Rose UM, Kramer P, Jong FH de, Themmen APN. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Müllerian hormone null mice. *Endocrinology* 2007;**148**:2301–2308.
- Visser JA, Schipper I, Laven JSE, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency. *Nat Rev Endocrinol* 2012;**8**:331–341.
- Visser JA, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2005;**234**:81–86.
- Voorhuis M, Broekmans FJ, Fauser BCJM, Onland-Moret NC, Schouw YT van der. Genes involved in initial follicle recruitment may be associated with age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;**96**:E473-479.
- Weenen C, Laven JSE, Von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BCJM, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;**10**:77–83.
- Wesselborg S, Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2015;**72**:4721–4757.
- Wilson T, Wu XY, Juengel JL, Ross IK, Lumsden JM, Lord EA, Dodds KG, Walling GA, McEwan JC, O'Connell AR, *et al.* Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod* 2001;**64**:1225–1235.

Références bibliographiques

- Winkler N, Bukulmez O, Hardy DB, Carr BR. Gonadotropin releasing hormone antagonists suppress aromatase and anti-Müllerian hormone expression in human granulosa cells. *Fertil Steril* 2010;**94**:1832–1839.
- Winship AL, Stringer JM, Liew SH, Hutt KJ. The importance of DNA repair for maintaining oocyte quality in response to anti-cancer treatments, environmental toxins and maternal ageing. *Hum Reprod Update* 2018;
- Wolff M von, Germeyer A, Liebenthron J, Korell M, Nawroth F. Practical recommendations for fertility preservation in women by the FertiPROTEKT network. Part II: fertility preservation techniques. *Arch Gynecol Obstet* 2018;**297**:257–267.
- Xia T, Fu Y, Gao H, Zhao Z, Zhao L, Han B. Recovery of ovary function impaired by chemotherapy using Chinese herbal medicine in a rat model. *Syst Biol Reprod Med* 2014;**60**:293–303.
- Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, *et al.* Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2001;**15**:854–866.
- Yang MY, Cushman RA, Fortune JE. Anti-Müllerian hormone inhibits activation and growth of bovine ovarian follicles in vitro and is localized to growing follicles. *Mol Hum Reprod* 2017;1–10.
- Yang MY, Fortune JE. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol Reprod* 2008;**78**:1153–1161.
- Yang Z-Y, Chian R-C. Development of in vitro maturation techniques for clinical applications. *Fertil Steril* 2017;**108**:577–584.
- Zhai J, Yao G, Dong F, Bu Z, Cheng Y, Sato Y, Hu L, Zhang Y, Wang J, Dai S, *et al.* In Vitro Activation of Follicles and Fresh Tissue Auto-transplantation in Primary Ovarian Insufficiency Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;**101**:4405–4412.

Références bibliographiques

- Zhang X, Li L, Xu J, Wang N, Liu W, Lin X, Fu Y, Luo L. Rapamycin preserves the follicle pool reserve and prolongs the ovarian lifespan of female rats via modulating mTOR activation and sirtuin expression. *Gene* 2013;**523**:82–87.
- Zheng W, Nagaraju G, Liu Z, Liu K. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2012;**356**:24–30.
- Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, Bondy C. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol Baltim Md* 1997;**11**:1924–1933.
- Zhou L, Xie Y, Li S, Liang Y, Qiu Q, Lin H, Zhang Q. Rapamycin Prevents cyclophosphamide-induced Over-activation of Primordial Follicle pool through PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in vivo. *J Ovarian Res* 2017;**10**:56.

ANNEXES

I. Annexe 1

Lettre d'intention PHRC ESIGON

Evaluation de la Sensibilité Individuelle à la GONadotoxicité de la chimiothérapie chez la femme jeune atteinte de cancer du sein

Accepté en 2017

En cours de mise en place



Appel à projets national en cancérologie 2016

Lettre d'intention / Letter of intent

La lettre d'intention est à rédiger en anglais pour permettre l'évaluation internationale

Date limite de soumission en ligne : 3 mars 2016 avant Minuit

Veillez cocher l'appel pour lequel vous soumettez votre projet

Si soumission PHRC-K :

<http://www.e-cancer.fr/Institut-national-du-cancer/Appels-a-projets/Appels-a-projets-en-cours/phrc2016>

Si soumission PRME-K :

<http://www.e-cancer.fr/Institut-national-du-cancer/Appels-a-projets/Appels-a-projets-en-cours/prmek2016>

In the frame of DGOS calls for proposals:

First submission Previous submission (fill in section dedicated to previous submission in the last page):

Titre de l'étude envisagée, précédé par son acronyme¹
ESIGON 02 : Evaluation de la Sensibilité Individuelle à la GONadotoxicité de la chimiothérapie chez la femme jeune atteinte de cancer du sein
Project title
Evaluation of individual sensitivity to the gonadotoxicity of chemotherapy in young patients with breast cancer

GENERAL INFORMATION

First name and name of coordinator :	SONIGO
Specialty	Reproductive Medicine
Service ou département - Unit or department	Reproductive Medicine and Fertility Preservation
Name and adress of the hospital	Hôpital Jean Verdier, avenue du 14 juillet, 93140 Bondy
Phone number	0148026850
E-mail	Charlotte.sonigo@gmail.com
Physician, dental practitioner / Biologist / Nurse, other paramedical :	Physician

Previous grants in the frame of DGOS calls (List with: year, ref number, state.):	None
--	-------------

Research domain	
------------------------	--

¹ L'acronyme sera formé d'un nombre de lettres inférieur à 15, suivi de 2 chiffres (01 le plus souvent, ou 02 s'il s'agit du 2^{ème} projet dans la continuation d'un 1^{er} projet portant le même titre, etc...

-Organ, tumor location : -Others :	Tumor location : breast Studied organ : ovary
Keywords -Coordinator domain : -Whished reviewer domain:	Reproductive endocrinology and medicine Oncofertility Oncofertility

Affiliated institution responsible for the budget from ministry of health	APHP, URC-CIC Paris Descartes Necker/Cochin Site Cochin, Hôpital Tarnier 89, rue d'Assas 75006 Paris
Approximate level of funding required (K euros):	430 Keuros

First name and name of the methodologist :	Naïm Bouazza
Name and adress of the hospital	URC-CIC Paris Descartes Necker/Cochin Site Cochin, Hôpital Tarnier 89, rue d'Assas 75006 Paris
Phone number	01 58 41 33 85
E-mail	naim.bouazza@aphp.fr
First name and name of the economist (if any)	
Name and address of the establishment:	
Phone number	
E-mail	

Organization responsible for project management:	DRCD (Hôpital Saint Louis, APHP) et Unité de Recherche Clinique Paris Descartes Cochin
Organization responsible for quality assurance:	DRCD (Hôpital Saint Louis, APHP) et Unité de Recherche Clinique Paris Descartes Cochin
Organization responsible for data management and statistics :	Unité de Recherche Clinique Paris Descartes Cochin

Anticipated number of recruiting centers (NC)	9
Anticipated number of scheduled patients	330

Co-investigators (1 à n)								
N°	Name	First name	Town	Country	Hospital	E-mail	Tel	Speciality
1	Grynberg	Michael	Bondy	France	Jean Verdier Hospital	Michael.grynberg@aphp.fr	+3314802 6850	Obstetrician Gynecologist
2	Eustache	Florence	Bondy	France	Jean Verdier Hospital	Florence.eustache@aphp.fr	+3314802 5887	Embryologist
3	Sermondade	Nathalie	Bondy	France	Jean Verdier Hospital	Nathalie.sermondade@aphp.fr	+3314802 6881	Embryologist
4	Toledano	Alain	Paris	France	American Hospital of Paris	Alain.toledano@gmail.com	+3314641 2525	Oncologist
5	Espié	Marc	Paris	France	Saint Louis Hospital	marc.espie@aphp.fr	+3314249 4949	Oncologist
6	Saghatchian	Mahasti	Villejuif	France	Gustave Roussy Institute	mahasti.saghatchian@gustaveroussy.fr	+3314211 4211	Oncologist
7	Chabbert-Buffet	Nathalie	Paris	France	Tenon Hospital	nathalie.chabbert-buffet@aphp.fr	+3315601 7000	Endocrinologist
8	Pierga	Jean Yves	Paris	France	Curie Institute	Jean-yves.pierga@curie.fr	+3314432 4642	Oncologist
9	Pirello	Olivier	Strasbourg	France	CMCO	olivier.pirello@chru-strasbourg.fr	+3338811 6768	Obstetrician Gynecologist
10	Conri	Vanessa	Bordeaux	France	Bordeaux University Hospital	vanessa.conri@chu-bordeaux.fr	+3357821 183	Obstetrician Gynecologist
11	Rousset Jablonski	Christine	Lyon	France	Centre Leon Berard University Hospital	Christine.rousset-jablonski@lyon.univ-lyon1.fr	+3347878 5129	Gynecologist

References

List of the main publications (5 maximum) justifying the project in the national and international context

- 1: Genetic variation may modify ovarian reserve in female childhood cancer survivors, Van Dorp et al, Human Reprod, 2013
- 2: A large-scale candidate-gene association study of age at menarche and age at natural menopause, Kraft et al, Human Genet, 2010
- 3: A genome-wide association study of early menopause and the combined impact of identified variants, Perry et al, Human Mol Genet, 2013
- 4: ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria, Human Reprod 2011
- 5: Fertility preservation in women with cancer, De Vos et al, Lancet 2014

RESEARCH PROJECT

Rational (Context and hypothesis, max 320 words)

Gonadotoxicity is a well-known long-term side effect of cancer treatment in young patient having survived malignant diseases. More than 80% of women of childbearing age, treated for breast cancer with standard protocol of neoadjuvant (4 cycles of 5-Fluorouracile – Epirubicine- Cyclophosphamide (FEC) and 4 cycles of doxorubicin) or adjuvant chemotherapy (3 FEC and 3 doxorubicin), show an alteration of their ovarian reserve 2 years after completion of the treatment, in relation with the chemotherapy-related follicular loss. Therefore, according to the extent of the follicular damages, the gonadal function may vary from moderate to severe diminished ovarian reserve (DOR) and possibly to the ultimate stage of premature ovarian insufficiency (POI).

Post chemotherapy gonadal function may depend on the chemotherapy regimen, the total cumulative dose, and patient's characteristics (age, ovarian reserve) at the time of treatment.

Nevertheless, variations in the long-term ovarian toxicity among cancer survivors who received similar treatments suggest that, besides environmental, pathologic and iatrogenic variables, genetic variations may be at play. Indeed, in healthy women, age at natural menopause varies from 40 to 55 years, with a mean of 50 years. As there is a strong familial concordance for age at menopause, many studies of large genome-wide association (GWAS) found an association between the age and variants of some genes involved in DNA repair, DNA maintenance and folliculogenesis as initial follicle recruitment.

Since these genes may have an influence on the ovarian reserve (together with the effects of gonadotoxic treatment regimens), our hypothesis is that genetic polymorphisms known to be associated with age at menopause (*BRSK1* (rs1172822), *ARHGEF7* (rs7333181), *MCM8* (rs236114), *PCSK1* (rs271924), *IGF2R* (rs9457827), *TNF* (rs909253), *AMH* (rs10407022) and *AMHR2* (rs2002555)) could be linked to the intensity of the follicular decline after chemotherapy.

Originality and innovative aspects (max 160 words)

Currently, patients' age, serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels and the ultrasonographic antral follicle count (AFC) are considered the most accurate predictive factors of post chemotherapy ovarian function. However, they may have some limitations since important inter-individual variations in the ovarian reserve post chemotherapy are reported in patients displaying similar age, AMH and AFC. A possible explanation could be the variable ovarian sensitivity to chemotherapy among cancer patients, which could be genetically determined.

To our knowledge, the possible implication of genetic polymorphisms, known to be associated with age at menopause, with depth of ovarian decline in adult survivors of cancer has not been done yet.

Focus of research

Health technology (tick and then detail):

Drugs Devices

Procedures and organizational systems used in health care (including Health services²)

If relevant: date of CE mark / market authorization

Please detail :

Keywords (5):

Fertility preservation, Antral follicle count, Anti-Müllerian Hormone, ovarian reserve, genetic polymorphisms

Main objective (Detail, max 48 words)

To evaluate whether genetic polymorphisms, previously identified as being correlated with age at menopause in the healthy population, are associated with the intensity of the follicular decline following chemotherapy in young breast cancer survivors.

² <http://htaglossary.net>

Tick one:

Hypothesis Description feasibility Tolerance efficacy X
 Safety efficiency Budget impact Organization of care

Tick one:

Etiology Causality³ Diagnosis Prognosis X
 Therapeutics (impact on clinical end-points⁴)
 Therapeutics (impact on intermediate end-point⁵)
 Compliance Effective Practice Research methodology
 Qualitative Research Others

Secondary objectives (detail, max 160 words)

To evaluate the association between genetic polymorphisms and other parameters related to female fertility after chemotherapy:

- Menstrual cycle profile
- Pregnancy rates

To assess the evolution of ovarian reserve parameters at the end of chemotherapy

Primary end point (linked with the main objective)

Association between polymorphism of genes associated with age at menopause and the follicular decline 2 and 5 years after chemotherapy assessed by a DOR or a POI. Although the definition of POI is well established, we arbitrarily decided to use the validated Bologna criteria, commonly used in reproductive medicine, to define the DOR.

- Normal ovarian reserve: persistence of menstrual cycle, FSH<40 IU/L and AMH>1.1 ng/mL or AFC >7 follicles
- Moderate DOR: persistence of menstrual cycle, FSH<40 IU/L and 0.5≤AMH≤1.1 ng/mL or 5≤AFC≤7 follicles
- Severe DOR: persistence of menstrual cycle and AMH<0.5 ng/mL or AFC<5 follicles
- POI is defined by amenorrhea above four months and FSH level ≥40 IU/L in women before 40 years.

Secondary end points (linked with the secondary objectives)

Association of genetic polymorphisms with:

- Menstrual cycle profile: normal (26-35 days); short (<26 days); Spaniomenorrhea (>35 days); amenorrhea (>4 months)
- Pregnancy rates
- AMH and AFC values 1 and 2 years following the end of chemotherapy

Study population**Main inclusion and exclusion criteria**

³ Studies designed to determine the causes of a disease, the risk of being exposed to a drug, a pollutant etc

⁴ Example : reduction of myocardial infarction incidence, of mortality

⁵ Example : reduction of serum cholesterol, improvement of a pain scale

Inclusion criteria:

- Age: 18 – 38 years
- Breast cancer
- BMI ≤ 30 Kg/m²
- Antral Follicular count: 10-30 follicles
- Regular and ovulatory menstrual cycles
- Standard chemotherapy protocol (3 FEC and 3 doxorubicin or 4 FEC and 4 doxorubicin)
- Free consent, informed and written, dated and signed by the patient and the investigator
- Patient affiliated to the French National Social Security System

Exclusion criteria

- Previous history of chemotherapy, ovarian surgery or endometrioma
- Ovarian Polycystic Syndrome
- DOR or POI before chemotherapy

Design (tick + detail max 320 words)

Meta analysis Randomized clinical trial if yes : Open Single blind Double blind

Systematic reviews Pragmatic studies

Quasi-experimental studies (non randomized cohorts ...) Prospective cohort study

Case-control study Cross-sectional study

Retrospective cohort Administrative / hospital inpatient database research

Modelisation Case series Qualitative studies Others

Please detail :

This is a multicentric and prospective study of a cohort of young women with breast cancer. Eligible subjects followed in the different participating centers will be included in this study. Informed consent will be obtained from all participating individuals before blood sample collection and molecular studies. AMH measurement and AFC will be performed before the cancer treatment randomly during the menstrual cycle phase. In the same time, blood samples will be taken for the genotyping. All patients will receive adjuvant or neoadjuvant chemotherapy containing cyclophosphamide, epirubicin, 5-FU and doxorubicin. Patients will be evaluated 6, 12, 24, 36, 48 and 60 months after the end of the treatment. A clinical (menstrual cyclicity) and hormonal (AMH, FSH) evaluation associated with ultrasound evaluation of AFC of enrolled patients will be performed. Blood samples will be taken in the early follicular phase (day 2-5) of a spontaneous period in women with regular menstruations. In amenorrheic women, evaluation will be randomly performed.

If health-economics analysis (tick + detail max 320 words) :		
Cost-utility analysis <input type="checkbox"/>	Cost-effectiveness analysis <input type="checkbox"/>	Cost-benefit analysis <input type="checkbox"/>
Budget impact analysis <input type="checkbox"/>	Cost-minimization analysis <input type="checkbox"/>	Cost-consequence analysis <input type="checkbox"/>
Cost of illness analysis <input type="checkbox"/>	Others <input type="checkbox"/>	
Please detail :		
In the case of a drug trial:		
Phase: I <input type="checkbox"/>	phase: II <input type="checkbox"/>	phase: I/II <input type="checkbox"/>
phase: III <input type="checkbox"/>	phase: IV <input type="checkbox"/>	
If comparison groups :		
Experimental group (detail max 48 words)		
Control group (detail max 48 words)		

INCLUSIONS

Duration of participation of each patient (days/months/years):
6 years
Anticipated duration of recruitment (DUR) (in months):
18 months
Total number of scheduled patients / observations to be recruited (NP) (3 digits + Justification of sample size max 80 words):
Based on the following assumptions: i) a significance level of 0.005 for multiple testing, ii) an additive inheritance model and iii) a proportion of patients with altered ovarian reserve of 80% after treatment, a sample size of 280 patients will allow to detect at least an odds ratio from 1.9 to 2.6 with a power of 80% respectively for minor allele frequency ranging from 8.3% to 38.9% (i.e. range of minor allele frequencies for the selected SNPs). Assuming that 15% will be lost to follow-up over the study, a total of 330 patients will be included.

Number of patients / observations to be recruited / month / center ((NP/DUR)/NC) (2 digits + Justification if more than 2 patients/month/center)

Gustave Roussy and Curie Institutes are Anti-Cancer Hospitals, having a mean of 100 women < 38 years diagnosed with breast cancer per year. Saint Louis is a center of breast diseases with a mean of 70 women < 38 years diagnosed with breast cancer per year.

Expected number of patients eligible in the centers

N°	Name	Surname	Town	Country	Expected recruitment/month	Total
1	Jean Verdier Hospital		Bondy	France	2	36
2	Tenon Hospital		Paris	France	1	18
3	Gustave Roussy Institute	IGR	Villejuif	France	4	72
4	Saint Louis Hospital		Paris	France	4	72
5	American Hospital of Paris		Paris	France	1	18
6	Curie Institute		Paris	France	3	54
7	CMCO	CMCO	Strasbourg	France	1	18
8	Bordeaux University Hospital		Bordeaux	France	1	18
9	Centre Leon Berard University Hospital		Lyon	France	1	18

Participation of a research network (Detail max 32 words)

INSERM, unit U 1185, Le Kremlin Bicêtre, France
Theme: Reproduction and Regulation of the Hypothalamo-Pituitary-Gonad Axis

Participation of structures coordinated by INCa or DGOS (ministry of health): biobanks (tumorothèques) clinic-biological databases (CBC), centres for data analysis (CTD), molecular genetic platforms, etc...

No

Participation of industry (Detail max 64 words)

No

Others aspects to insure the feasibility of the project (Detail max 64 words)

The Inserm Unit is specialized in ovarian function, gene associated with primary ovarian insufficiency and works on fertility preservation.
The service of reproductive medicine of Jean Verdier Hospital is specialized in fertility preservation.
All other participant centers are references in the domain of breast oncology and treat a large proportion of young women facing with breast cancer.

Expected patient or public health benefit (Detail max 320 words)

Over the past decade, advances in diagnoses and treatments have dramatically increased the rates of cure for young patients with cancer. As a consequence, a new population of cancer survivors has emerged whose fertility is compromised after cancer therapy. Currently, evaluating the likelihood of DOR or POI after healing remains a major issue. Nevertheless, information about infertility and the possibility of fertility preservation (FP) leads to improved quality of life and diminished distress in all patients facing with cancer. Therefore, FP counselling by a specialist should be offered to all patients with reproductive potential before starting cancer treatment. Oncofertility is a novel interdisciplinary approach aiming at maximizing the reproductive future of cancer survivors. Since the last decade, this specialty has been developed and different FP techniques are now offered to young women facing with cancer. Most of these techniques are still experimental. Among them, some are invasive such as cryopreservation of ovarian cortex which requires surgery. Other techniques, as aspiration of immature oocytes from unstimulated ovaries, followed by *in vitro* maturation are easier. At present, cryopreservation of mature oocytes after ovarian stimulation remains the most established technique but is not possible in emergency and is contraindicated in some situations such as estrogen-sensitive diseases.

Thus, the oncofertility strategy is based on patient's age, ovarian reserve, type of chemotherapy ... If genetic polymorphisms are found to be associated with ovarian reserve after chemotherapy in young women having healed from breast cancer, this project will allow to improve FP counseling prior to cancer treatment. Indeed, based on genetic analysis of genetic polymorphisms, the most adjusted FP strategy will be offered.

II. Annexe 2

The past, present and future of fertility preservation in cancer patients

Charlotte Sonigo, Nathalie Sermondade, Julie Benard, Alexandra Benoit,

Joanna Shore, Christophe Sifer & Michael Grynberg

Future Oncology

Septembre 2015

REVIEW

Special Focus Issue: *Future Oncology*: a 10-year anniversary issue

The past, present and future of fertility preservation in cancer patients

Charlotte Sonigo^{1,2,3}, Nathalie Sermondade⁴, Julie Benard^{1,2}, Alexandra Benoit¹, Joanna Shore⁵, Christophe Sifer⁴ & Michael Grynberg^{*1,2,6}

Fertility preservation strategies have been developed for men and women whose fertility is compromised for medical reasons, especially in case of cancer therapy. At present, many reliable options for preserving fertility are available. However, a part of these fertility preservation methods, despite being promising, are still considered experimental. Nevertheless, there are still situations where no methods can be offered. Remarkable scientific progress is currently underway to improve available techniques and to develop new technologies to solve problems with current fertility strategies. These new options may drastically change reproductive options for young patients facing germ cell loss and hence sterility. Therefore, oncofertility counseling by a specialist is recommended for all young cancer patients having to undergo treatment that may reduce fertility potential.

Over the past decades, advances in the diagnosis and treatment of oncological diseases have markedly improved the rates of cure for many children and young adult cancers [1]. As a consequence, cancer mortality has dramatically decreased, leading to the emergence of a new population of young men and women whose fertility is compromised for medical reasons. Indeed, chemotherapy, radiotherapy and/or surgery, often used as the first line of cancer treatment, may alter the potential of natural fertility, mainly by gonadal dysfunction or modification of pelvic anatomy. At worst, patients may face sterility due to premature ovarian insufficiency (POI) or azoospermia. The risk of impaired fertility in cancer survivors depends on various factors including patients' characteristics, the nature and stage of the malignant disease, type and doses of treatments. Currently, predicting the individual risk of POI or azoospermia remains a challenge. Nevertheless, information regarding the risks of infertility and fertility preservation (FP) counseling may contribute to improving the quality of life and the coping of patients with the burden of cancer treatment. Therefore, oncofertility counseling by a specialist is now recommended for all young cancer patients having to undergo treatment that may reduce the fertility potential [2–5]. Oncofertility is a new interdisciplinary approach that aims to optimize the reproductive future of young cancer survivors after healing. Indeed, the major advances in reproductive medicine and biology now allow FP techniques to be offered from childhood to adulthood. Patients' age at cancer diagnosis is a primordial predictive factor for long-term sterility in both males and females, and has therefore to be taken into account before considering and performing FP. Moreover, it is important to be aware that some of these techniques remain experimental and depend upon future improvements. The present article aims to review current strategies of FP and the future of oncofertility.

KEYWORDS

- fertility preservation
- *in vitro* folliculogenesis
- oncofertility • ovarian tissue cryopreservation
- sperm cryopreservation
- vitrification

¹Department of Reproductive Medicine, Hôpital Jean-Verdier, Avenue du 14 Juillet, 93140 Bondy, France

²University Paris XIII, 93000 Bobigny, France

³Unité Inserm U1185, Université Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre, France

⁴Department of Cytogenetic & Reproductive Biology, Hôpital Jean-Verdier, Avenue du 14 Juillet, 93140 Bondy, France

⁵Department of Obstetrics & Gynecology, Hôpital Jean-Verdier, Avenue du 14 Juillet, 93140 Bondy, France

⁶Unité Inserm U1133, Université Paris-Diderot, 75013 Paris, France

*Author for correspondence: Tel.: +33 1 48 02 68 56; FAX: +33 1 48 02 68 60; michael.grynberg@aphp.fr

FP in boys & men

Though results are still controversial, semen parameters from cancer patients seem to be impaired when compared with normal fertile men, especially in case of testicular cancer or leukemia [6,7]. However, the most deleterious impact on spermatogenesis for cancer patients is induced by chemotherapy and/or radiotherapy. These alterations may be moderate or extreme, transient or long lasting. Effects of chemotherapy on spermatogenesis vary, depending on the types of drugs and cumulative doses. Nitrogen mustard derivatives, alkylating drugs, cisplatin and combination of chemotherapy with whole-body irradiation seem to have the most detrimental effect on testicular function [8]. Age at administration is not a prognostic factor for future fertility, as chemotherapy has an equally negative effect on germ cells whether it was given during childhood, adolescence or adulthood [9]. Because predicting the exact chances of spermatogenesis recovery is difficult, if not impossible, FP techniques should be proposed to all boys and men facing cancer therapy, especially as a large majority of patients, even boys and adolescents, report a concern regarding fertility potential after cancer diagnosis [10].

For men or postpubertal adolescents with cancer, sperm cryopreservation is well recognized as an effective method of FP since years [4]. In contrast, techniques currently proposed for prepubertal boys have not yet been successfully tested in human and still remain experimental [4].

• Past

Sperm cryopreservation and the subsequent storage of semen samples is the most effective method for FP in men and adolescents producing sperm in the ejaculate. As semen was first stored in 1953 [11] and can be used for conception successfully after several decades in storage [12], it should be considered before any cancer treatment, due to the risk of genetic damage in sperm collected after initiation of chemotherapy or radiotherapy [13].

For years, obtaining samples by ejaculation after masturbation was the only available method. Moreover, a large number of semen samples should have been collected before cancer treatment in order to allow cancer patients to become genetic fathers after healing.

Improvements of assisted reproductive techniques and development of alternatives to obtain spermatozoa currently allow the majority of adult

and adolescent cancer patients to preserve their fertility with real chances of future fatherhood.

• Present

Sperm cryopreservation and subsequent utilization, often requiring assisted reproductive techniques, remains the most effective method for FP in men and adolescents producing spermatozoa. At each step of this strategy, such as collection, freezing and utilization, challenges persist. The case of adolescents is particularly concerning as the timeline of spermatozoa production is not well known.

Sperm collection

Obtaining samples by ejaculation is the conventional method, and the simplest. When cancer treatment is urgent, the usual recommendation of 2–5 days abstinence for sperm collection can be more flexible [14]. However, ejaculation may be a challenge for patients who have difficulties because of stress, severe illness or sexual inexperience. In these situations, when men or young pubertal boys are unable to collect samples thought masturbation, electroejaculation or even testicular sperm extraction may be options [15]. Electroejaculation is a safe and feasible procedure, though it is performed under general anesthesia. Testicular sperm extraction can also be proposed in case of ejaculation failure or when azoospermia is found after conventional sperm collection. Nevertheless, these two techniques are not necessarily easily available in all centers and can be difficult to organize in an emergency situation.

Sperm freezing & use

Standard freezing procedures involve exposure to cryoprotectants and temperature reduction followed by transfer into liquid nitrogen. Assisted reproductive techniques are then needed to use cryopreserved sperm. The development of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) allowed assisted reproduction even in case of very low semen parameters. Results of intrauterine insemination, *in vitro* fertilization (IVF) or ICSI with sperm cryopreserved for FP, are generally good and led to real chances of fatherhood [16].

However, quality of sperm obtained in the context of FP is highly variable, from normal semen parameters to extreme oligo-asthenoteratozoospermia, or even azoospermia. This could be due to preexisting conditions, or cancer itself [6,7]. Conventional procedures may then not be appropriate, especially when very low

numbers of motile spermatozoa are obtained. Some methods have been proposed to cryopreserve low numbers of sperm or individual spermatozoa, using different devices such as empty zona pellucida, cryoloops or ICSI pipettes [17] or, more recently, Cryolock device with encouraging results [18].

The case of adolescents

The main challenge with adolescents is to define the pubertal stage or the age of the onset of spermatozoa production. Indeed, Tanner stages are not always in relation with the beginning of spermatogenesis and spermaturia was reported in boys without clinical sign of puberty [19]. Therefore, many studies have used only chronological age to assess the beginning of spermarche [20–22]. Age of the onset of spermatozoa production is estimated to be around 13–14 years [23]. In a large multicenter retrospective study performed in male patients aged 11–20 years, sperm collection by masturbation was feasible for 81% of patients in the 11–14-year-old group [20].

If sperm cannot be collected by masturbation, still controversial for adolescents, other techniques can be used. Electroejaculation led to adequate material for cryopreservation in more than half of pubertal boys [24,25] and a publication reports success before 11 years old [24]. Testicular sperm extraction can also be proposed with some success [20], but remains rarely used in this context.

• Future

As prepubertal boys do not produce mature sperm cells, cryopreservation of spermatozoa is not an option. When these boys require FP, immature testicular tissue can be recovered and cryopreserved for potential future use with testicular tissue grafting, spermatogonial stem cell transplantation or *in vitro* maturation (IVM) of spermatogonial stem cells [26]. At last, *in vitro* production of spermatozoa from stem cells other than spermatogonial stem cells is currently studied in the rodent model [27]. Although still experimental and only tested in animal models, these techniques appear to be very promising.

Testicular tissue biopsy & cryopreservation

Testicular tissue biopsy is performed under general anesthesia, usually paired with another clinical procedure such as bone marrow biopsy or central line placement. The sample can concern a single large volume (between 80 and 250 mm³

based on testicular size) or multiple biopsies. The first option is preferred because it minimizes manipulation and preserves enough spermatogonial stem cells for FP [26]. Samples may then be preserved as a spermatogonial stem cell suspension or as testicular tissue. Most of the centers performed immature testicular tissue freezing, leaving the options of all techniques for future utilization. Two freezing protocols can be used for this tissue cryopreservation: slow freezing or vitrification. Slow freezing is currently applied in clinical practice but is time consuming. Vitrification, aimed to increase the survival rate of spermatogonial stem cells after thawing, is still under investigation in xenografting models [28].

Testicular tissue grafting

Currently, grafting is not performed in humans after immature tissue testicular cryopreservation: all described experimentations were performed in animal models, sometimes using human tissue. Full spermatogenesis was reported in xenografts from different species [26], but restoration of full spermatogenesis has, so far, not been reported when prepubertal human testicular tissue was xenografted into nude mice [29,30]. Moreover, little is known about the functionality of the sperm generated in the grafts, but results seem promising as it was possible to obtain offspring using sperm that had developed in intratesticular xenografts, for example, in the pig model [31,32]. Main advantages of this testicular tissue transplantation strategy are that interactions between spermatogonial stem cells and supporting cells are maintained and it allows men to reproduce naturally, without need for assisted reproductive technologies. However, a major concern regarding autotransplantation is the risk for malignancy recurrence by reintroducing malignant cells, especially in case of hematopoietic malignancies. Therefore, this technique should not be proposed when immature testicular tissue was frozen in these situations. Whenever such a risk is possible, injection of decontaminated spermatogonial stem cell suspension is one possible solution.

Spermatogonial stem cell injection

This technique was first described in the mouse 20 years ago by Brinster and Zimmerman [33]. It consists in the introduction of a testicular cell suspension containing spermatogonial stem cells through the efferent duct in the rete testis. In rodents, sperm obtained with this technique are

able to fertilize oocytes *in vivo* or after assisted reproductive technology [34]. More recently, rhesus monkey spermatogonial stem cell injection was performed: mature sperm cells were found in the ejaculate in 60% of the prepubertal recipients and spermatozoa obtained were able to fertilize oocytes after ICSI [35]. In contrast to spermatogenesis obtained from immature testicular tissue, it seems that spermatogenesis might be conserved long after spermatogonial stem cell injection. The main drawback of this option is that spermatogonial cell extraction from immature testicular tissue led to the obtention of small samples containing very few spermatogonial stem cells [36].

This technique remains particularly interesting in case of potential contamination of cryopreserved testicular tissue. Separation of spermatogonial stem cells from malignant cells before transplantation is necessary and feasible. Nevertheless, there is currently no specific marker for purifying spermatogonial stem cells, and the method of decontamination is insufficient [37]. Therefore, this technique remains experimental.

In vitro spermatogenesis

Spermatozoa derived from spermatogonial stem cells

IVM of spermatogonial stem cells into mature spermatozoa that can be used for intracytoplasmic injection of oocytes is another alternative under investigation. Achievement of complete *in vitro* spermatogenesis of mouse testicular germ cells in a 3D culture system was reported [38,39]. Nevertheless, the ability of culture-produced spermatozoa for generating offspring needs to be further determined.

Spermatozoa derived from stem cells other than spermatogonial stem cells

Recently, primordial germ cell-like were produced from pluripotent stem cells in mice. Once transplanted into the testis of sterile recipient mice, these *in vitro*-derived cells developed into spermatozoa that could fertilize oocytes by ICSI and eventually produce fertile offspring [9]. Very recently, human primordial germ cells were obtained from germline competent pluripotent skin stem cells [40]. Numerous uncertainties regarding genetic and epigenetic consequences for the offspring remain. Although this line of research might be a last hope for patients having lost their germ cells or when FP was not performed, any clinical application in human beings remains speculative.

FP in girls & women

Chemotherapy, radiotherapy and/or surgery used to increase life expectancy for female cancer patients often induce ovarian follicle depletion, stromal fibrosis and/or vascular injury resulting in decreasing fertility to primary ovarian insufficiency. The extent of ovarian damage depends on the type and dose of chemotherapy [41], dose of radiotherapy, fractionation scheme and irradiation field as well as age and ovarian reserve before treatment [42]. Women age at the time of chemotherapy or radiotherapy administration is one of the most predictive risk factor of POI after the end of treatment [43,44]. Indeed, due to the physiological reduction of ovarian reserve with age, the impact of gonadotoxic treatments on follicle damages is more significant in older patients [43,45]. As a result, lower doses of chemotherapy are required to induce POI with increasing age [45]. Follicular depletion is most pronounced in women receiving alkylating agents as cyclophosphamide, total body irradiation before hematopoietic stem cell transplantation or direct irradiation of the ovaries [43]. The assessment of infertility risk and the selection of an individualized strategy to optimize fecundity after cancer treatment are huge challenges. Guidelines recommend systematic FP counseling and techniques adjusted to the patient, type of cancer, treatment proposed and time available [2].

Ovarian suppression with gonadotropin-releasing hormone analogues (GnRH agonists) during chemotherapy has been proposed for years to restrict ovarian damage during chemotherapy, but clinical effects are still very controversial.

At present, most established FP methods include ovarian transposition, which can be offered to women having to undergo pelvic irradiation [46], and oocyte or/and embryo cryopreservation after controlled ovarian hyperstimulation (COH) [4]. This last technique, derived from routine reproductive clinical practice has been adapted over the past decades for oncological patients, but still presents drawbacks and cannot be proposed to all female candidates for FP. Consequently, whereas other FP techniques such as ovarian tissue cryopreservation (OTC) or IVM of oocytes retrieved without previous stimulation are still considered experimental [4], they may be offered to patients when COH cannot be applied.

In order to increase chances for female cancer survivors to become genetic mothers, different approaches are proposed: association between available methods, improvement of experimental

techniques or development of new strategies as artificial ovaries or *in vitro* folliculogenesis. One other way of investigation is to prevent follicle loss induced by cancer treatment.

- **Past**

GnRH agonists

GnRH agonists have been proposed for many years to induce ovarian suppression and to protect ovarian function during chemotherapy [47]. Nevertheless, the role of GnRH analogs in FP has been constantly debated and their use is considered experimental due to conflicting clinical evidence and paucity of data regarding their mechanism for ovarian protection. Underlying mechanisms to explain how GnRH analog administration protects follicular reserve are controversial, since human primordial follicles are not directly under pituitary gonadotropin influence [48]. Several other mechanisms have been suggested, such as modification of ovarian perfusion inducing decreased exposure of the primordial follicles to the cytotoxic agents [49] or upregulation of antiapoptotic molecules [50]. A recent study suggested that, in mice, the beneficial role of GnRH agonists for FP depends on the type of chemotherapy administered [51].

In humans, more than 30 studies have been performed including large randomized clinical trials [52]. Analysis of the contradictory results is difficult, as inclusion criteria or primary objectives differ between trials. Nevertheless, although data do not support the clinical validity of this approach for female FP, GnRH analog administration during chemotherapy represents an efficient contraception, reduces risk of menstrual hemorrhagic bleeding and may improve disease survival rate in breast cancer patients [52].

Currently, national and/or international guidelines on FP are in accordance with the fact that the potential advantage of GnRH analogs for preserving fertility is unclear. Although the American Society of Clinical Oncology (ASCO) [4] does not consider GnRH analogs as ‘a fertility preservation method’, other societies such as the International Society for Fertility Preservation (ISFP) Practice Committee proposed that ‘GnRH analogs cotreatment can be considered if there is no other option’ [2]. In addition, the FertiPROTEKT network, a collaboration of around 70 centers in Germany, Switzerland and Austria recommend GnRH analogs for ‘postmenarchal women up to the age of 40 years’ before chemotherapy [53]. For Canadians, others advantages of GnRH

analog, in particular the contraceptive effect, ‘may justify their use’ [54]. Overall, despite their controversial efficiency, GnRH analogs can be proposed in cancer patients, candidates for FP, ideally in combination with other ‘more active’ FP methods [3].

- **Present**

Oocytes and/or embryo cryopreservation after COH

Development of vitrification in reproductive biology has improved the results of oocyte [55] and embryo cryopreservation [56]. Indeed, survival and pregnancy rates [56,57] as well as perinatal outcomes [55] have been improved when compared with slow freezing. At present, vitrification has substituted the slow freezing method in the majority of fertility centers. Actually, oocyte and/or embryo vitrification after COH are the only FP techniques not considered experimental and should be proposed to all women candidates for FP when cancer treatment is not urgent, as COH takes 10–15 days. Nevertheless, concerns persist about the possibility of administering exogenous gonadotropins for breast cancer patients.

Young women with breast cancer represent a substantial proportion of patients referred for FP. Most will receive adjuvant chemotherapy, and the time between primary surgery and the start of chemotherapy may be short. Moreover, ovarian stimulation is associated with a marked increase in circulating estradiol concentrations, which could be considered at risk tumoral dissemination, in particular when the tumor is still in place. Therefore, some oncologists still contraindicate COH for oocyte or embryo cryopreservation. Recently, new protocols of ovarian stimulation have been developed to reduce the time needed for obtaining mature oocytes and limiting the estradiol rise. First, COH can be start in an emergency, whatever the menstrual cycle phase, with no impairment in oocyte yield, maturation or fertilization rate [58]. These ‘random-start’ protocols have markedly reduced the time required for ovarian stimulation and even offer the option of two consecutive cycles of stimulation before the start of chemotherapy for increasing the number of mature oocytes cryopreserved [59]. Second, cotreatment with aromatase inhibitor (letrozole) is currently proposed for estrogen-positive breast cancer patient in order to decrease the circulating estradiol levels at the end of COH [60]. No impact on oocyte retrieval or parameters of ovarian stimulation, except for maximum estradiol

level, has been shown with this treatment [60]. Coadministration of tamoxifen citrate, a selective estrogen receptor modulator, competes with estrogens for binding sites in target tissues such as breast, is also evaluated in order to increase the safety of FP treatment strategies [61].

Embryo cryopreservation has been recognized as an established technique for many years. However, recent improvements in freezing methods have allowed oocyte vitrification to leave the field of experimental techniques [62]. The excellent results reported with oocyte cryopreservation are mainly coming from infertile patients [63] or women included in oocyte donation programs [55]. At present, only nine babies born from oocytes cryopreserved in cancer patients have been reported [64–70]. However, women having preserved their fertility before cancer treatment often need several years before using their frozen gametes. Therefore, the clinical success rate of this oocyte cryopreservation in case of FP for oncological indications, although very promising, is still not known.

Oocyte vitrification, with adapted protocols of COH, should be proposed whenever possible. Nevertheless, several lines of evidence indicate that the optimal number of oocytes to achieve a live birth in healthy patients ranges from 10 to 22 [71]. In cancer patients in whom only a limited number of stimulation cycle is usually possible, these values are rarely obtained. In addition, the potential of oocytes recovered during malignant diseases is still poorly established. As a consequence, a combination with other FP methods should be recommended. Furthermore, COH cannot be offered to prepubertal girls and is contraindicated by oncologists in some patients. Thus, in these situations, alternative FP methods, even if considered as experimental, have to be discussed.

IVM of oocytes

Retrieval of cumulus oocyte complexes (COCs) followed by their IVM and vitrification can be performed in emergency, whatever the cycle phase [72], and does not require ovarian stimulation. Initially developed for women suffering from polycystic ovarian syndrome (PCOS) to avoid COH syndrome [73], this technique has recently been reported as a promising option for cancer patient candidates to FP before urgent treatment, or when ovarian stimulation is contraindicated [74].

COCs can be retrieved *in vivo*, guided by transvaginal ultrasound or *ex vivo* at the time

of OTC. Thus, using this approach, IVM can be proposed to prepubertal girls [75], but the potential of immature oocytes retrieved in this population is not known.

Whereas just one live birth has been reported in a FP context [76], more than 5000 children have been born from this technique in PCOS patients without increased epigenetic or obstetrical risks [77,78]. Nevertheless, data obtained from infertile women showed that the competence of IVM oocytes is dramatically reduced when compared with oocytes recovered after ovarian stimulation [79]. Even if research focusing on reduction of the efficiency gap between *in vivo* and IVM is in progress with promising results [80,81], IVM should be systematically proposed in combination with other FP methods such as OTC.

Ovarian tissue cryopreservation

Whereas OTC and grafting is deemed experimental, it may be considered as a promising FP technique. Indeed, OTC allows the cryopreservation of a large amount of follicles, with possible restoration of both endocrine and exocrine ovarian function after transplantation. At present, OTC represents an option for urgent FP, in particular in situations of highly expected gonadotoxicity and when an established method cannot be applied. In addition, it should be considered as the only available technique in prepubertal girls. One of the major concerns remains the possible reintroduction of malignant cells after autotransplantation.

Current utilization, considerations & outcomes

As the follicular reserve of the ovary is age-dependent, patient age should be considered before proposing this treatment. Worldwide, the upper limit to undergoing this treatment seems to be around 35 years [82].

Whether ovarian biopsy (cortical strips) or unilateral oophorectomy should be performed is uncertain. Indeed, oophorectomy allows cryopreservation of a larger number of oocytes but removal of an entire ovary might be too aggressive and could further reduce the ovarian reserve in young patients [83]. Oophorectomy should systematically be performed, for very young prepubertal girls with small ovaries and for young women undergoing very aggressive therapies.

After thawing, cryopreserved ovarian tissue can be transplanted into the pelvic cavity (orthotopic transplantation) or another site (heterotopic transplantation). The pelvic cavity

provides the optimal environment for follicular development and is largely performed around the world [84].

So far, around 40 live births have been described after orthotopic graft [68]. Unfortunately, the number of transplantation performed worldwide is not known. In a series of 60 cases of orthotopic grafts, 11 (21%) women become pregnant with or without COH [85]. Although this technique is particularly proposed to prepubertal girls, no pregnancy has been described from ovarian tissue cryopreserved before puberty, probably because of the lack of perspective. Thus, the potential of this 'immature' ovarian tissue is not well established. Nevertheless, cryopreserved ovaries from immature ewes were autografted in adults and births had been observed after transplantation [86]. This experiment in the animal model is promising for the future fertility of prepubertal girls.

Whereas the main aim of OTC is FP, this is the only technique allowing restoration of endocrine ovarian activity after transplantation. In 2012, the first induction of puberty after autograft of cryopreserved ovarian tissue in prepubertal girl was reported [87]. The mean duration of ovarian endocrine function after transplantation is about 5 years, if follicle density is well preserved and can persist up to 7 years [88]. This aspect of OTC method is a real advantage to prevent the negative effect of POI on quality of life as osteoporosis, cardiovascular disease and depression.

Perspectives & challenges in OTC

OTC is a very promising technique but presents some drawbacks as the risk of reintroduction of malignant disease, especially in case of hematological malignancies, and loss of cryopreserved follicles following reintroduction. Thus, research is in progress to optimize outcomes and to avoid reimplantation of malignant cells.

Vitrification of OTC

Currently, slow freezing is applied in most of FP laboratories for OTC. Vitrification of ovarian cortex has been reported, essentially in animal models, as baboons [89] or xenografts of human ovarian strips into nude mice [90], in order to improve the number of primordial follicle cryopreserved and their capacity to survive after thawing. In these models, vitrification did not appear to negatively affect stromal tissue quality and preserved a

larger population of quiescent follicles after transplantation when compared with slow freezing. In human, the first live births after transplantation of vitrified-warmed tissue were recently described for patients suffering from POI [91,92]. Although this technique seems very attractive, it is still in development and needs further investigations.

Development of molecules to prevent follicle loss

The overall process of cryopreservation and subsequent thawing induces follicular loss through diverse mechanisms [93]. Some specific molecules, as PTEN inhibitor, are currently under investigation for limiting the follicular loss during gonadotoxic treatments administration.

Avoiding the risk of reimplanting malignant cells

One major concern about OTC is the risk of reimplanting malignant cells together with grafted tissue. This risk is particularly important for patients with hematological malignancies [94], which represent a large proportion of young women candidates for FP using OTC but exists for other cancers as well [95]. To avoid the menace of malignant cell reintroduction, robust methods to detect inclusion of cancer cells before transplantation of cryopreserved ovarian tissue are in development [96]. Another way of investigation is to treat ovarian cortex with dexamethasone prior to retransplantation, in order to induce leukemic cell death and to prevent reintroduction of malignant disease. These techniques are still in progress and though they might be a future option, since a non-negligible number of ovarian tissues cryopreserved may not be used safely. In addition, other methods such as *in vitro* culture of primordial follicles, artificial ovary or derivation of oocytes from stem cells are under development to enable young cancer survivors to improve the possibility of becoming genetic parents after healing without increasing the risk of recurrence of the disease.

• Future

New techniques in development

Artificial ovary

An alternative option for patients with high risk of ovarian involvement might be the development of an artificial ovary. The first step of this technique is to isolate primordial and preantral follicles from the stroma and malignant cells. The second step consists in the transfer of isolated follicles onto a 3D biodegradable scaffold supporting their

survival, proliferation and growth after transplantation. Currently, alginate [97] or fibrin and thrombin matrix are in development with *in vitro* [98] and *in vivo* experimentation using mice models [99]. These results seem promising and xenotransplantation of isolated human follicles is the next step to validate this model.

In vitro folliculogenesis

Another alternative to use cryopreserved ovarian tissue despite the presence of malignant cells within the ovary is *in vitro* folliculogenesis. As most follicles in the cryopreserved ovarian tissue are at the primordial stage, the earliest stage of follicular development, complete folliculogenesis must be achieved in order to develop competent oocytes capable of leading to embryos and subsequent live births. From the primordial stage, follicles and oocytes have to undergo every step of follicle development: initiation of primordial follicle growth, early growth from primary follicle to preantral stage and final maturation. Each of these steps are coordinated by complex mechanisms including interactions of hundreds of proteins [48]. Therefore, the development of an *in vitro* culture system aiming at producing mature oocytes capable for IVF, from the primordial follicles remains a challenge. Complete *in vitro* growth followed by IVF, embryo transfer and production of live offspring has been achieved in mice for many years [100,101]. Nevertheless, *in vivo* folliculogenesis in humans lasts more than 5 months as compared with 3 weeks for rodents, and the mechanisms required for maturing follicles are dramatically more complex. To date, activation of adult non-growing human ovarian follicles to the antral stage of development has been yet achieved [102]. Whether this technique can be combined with already established systems to complete the final stages of oocyte growth and maturation *in vitro*, it is currently unknown [103]. Moreover, if these techniques can be applied directly to ovarian tissue from children and adolescents are questionable. This query has been recently investigated and it seems that follicles from girls of all ages can be induced to grow *in vitro* [104]. Although this technique seems interesting, clinical applications for FP is still ill-established.

Derivation of germ cells from stem cell

In the past decade, the ovaries of mice and human beings were found to contain oogonial stem cells (OSCs) (or germline stem cells) [105,106]. In mice, these stem cells seem capable to develop

into oocytes under certain conditions and live offspring derived from these cells have been reported [105,107]. In humans, OSCs may generate early follicle structures in human tissues [108]. Nevertheless, it should be noted that OSCs are extremely scarce [107].

Embryonic or pluripotent stem cells can also be turned into primordial germ cell-like. A recent study has suggested that, after transplantation into mice, these cells, in combination with gonadic somatic cells, could generate germinal vesicle-stage oocytes [108]. Despite these promising results, controversial issues persist and more research is needed to improve the efficacy of OSCs isolation and development of germ cells into oocytes.

Uterus transplantation

In some gynecological cancers, such as uterine or cervix cancers, treatment combines both chemotherapy and hysterectomy. As a result, survivors are faced with two major concerns for fertility: potential follicle loss and absence of a functional uterus. Whereas follicle loss could be prevented by previously described techniques, the only option for these women become genetic mothers is with the assistance of a gestational surrogate mother. However, this procedure is not approved in most parts of the world for ethical, religious or legal reasons. Very recently, the first live birth of a healthy baby from a transplanted uterus has been described [109]. This result shows the feasibility of live uterus donation and can bring hope to patients without uterus. Nevertheless, this technique involves complex surgery and requires potentially harmful immune suppression to prevent rejection [110,111]. Recent progress in tissue engineering and organ regeneration may replace the need for a live donor and could thus circumvent obstacles [112]. Although these strategies are in development to help women born without uterus, one could project that it might be offered in the future for cancer survivors.

Future strategies to decrease the effect of gonadotoxic treatment

Another path of investigation to preserve fertility for patients who are able to receive gonadotoxic treatment is to prevent or attenuate, *in vivo*, follicular depletion induced by therapies. Since the mechanisms involved in ovarian effects of different drugs have been evaluated, specific molecules are under investigation. Nevertheless, these agents must not only be effective in preventing follicle loss but also must not interfere with

the anticancer activity of chemotherapy drugs. Some of the agents presented below are still in development in animal models.

AS101

AS101 is an immunomodulator that acts on blocking a molecular pathway (PI3K/PTEN/Akt) implicated in the activation of primordial follicles. As cyclophosphamide, one of the most gonadotoxic agents, induces follicle loss by depletion of follicular reserve secondary to an activation of this pathway, AS101 could be very interesting in this situation. In female mice treated with cyclophosphamide, AS101 has been shown to inhibit the activation and subsequent loss of the dormant primordial follicles, to protect ovarian reserve and to preserve fertility [113]. Moreover, this molecule does not interfere with the anti-neoplastic activity of cyclophosphamide [113]. Nevertheless, PI3K/PTEN/Akt pathway is ubiquitous and AS101 may have negative effect on other organs. Thus, clinical studies will be needed to verify the ability of AS101 to prevent cyclophosphamide-induced ovarian damage in female cancer patients.

Sphingosine-1-phosphate

Sphingosine-1-phosphate treatment inhibits apoptosis of ovarian follicles via a specific pathway named sphingomyelin pathway. There is evidence that this treatment reduces irradiation-induced primordial follicle depletion in rodents [114] and primates [115]. Nevertheless, this molecule must be injected directly into the ovary. In addition, there are important concerns regarding the use of antiapoptotic agents as it can interfere with therapeutic effects of chemotherapy and may prevent the natural atresia of DNA-damaged oocytes, leading to genetically compromised gametes and subsequent embryos [42].

Other molecules

Many other molecules with specific actions and targets are under experimentation and have been recently reviewed [42]:

- Imatinid, a competitive tyrosine kinase inhibitor, inhibits apoptosis via another specific pathway (c-Abl kinase). This molecule has been proposed to prevent follicle loss caused by cisplatin [116];
- Thalidomide, a potent inhibitor of VEGF, has been evaluated in mice receiving busulfan treatment [117];

- Tamoxifen, an estrogen receptor modulator, has been tested in rodents receiving chemotherapy [118] or whole-body irradiation [119];
- Nanoencapsulation strategies have been experimented in mice with lymphoma receiving arsenic trioxide treatment [120].

Conclusion

The aim of FP is to allow cancer survivors the possibility of building a family with the own patients' gametes. Combinations of currently available FP techniques, improvements on existing methods, developments of new technologies and personalized FP strategies are currently under investigation. Whereas many new, exciting, innovative and promising technologies are underway to offer maximum chances for cancer survivors to become genetic parents, the most important challenge remains to inform all patients facing with cancer about FP possibilities. Today, only around half of young women and men diagnosed with cancer receive counseling for FP possibilities [121]. Though not all patients are candidates for, or wish to benefit from FP techniques, all of them should be informed about strategies and alternative options for having a family after cancer, such as oocyte or spermatozoa donation. The main reasons for this information deficiency are the lack of time for the discussion, high costs of FP procedures in some countries and lack of convenient facilities [14]. At the time of cancer diagnosis, oncologists have to announce the disease, to explain the treatment, to reassure patients and families. Although FP is now part of the management of adolescents and young adult cancers [4,122], in most of situations, oncologist do not have enough time and knowledge to discuss issues of fertility after cancer. However, the recent development of oncofertility allows referring patients facing with cancer for specialized counseling and should facilitate access to FP for all cancer patients, whatever the age or the pathology.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

EXECUTIVE SUMMARY

Fertility preservation in men & adolescents

- Fertility preservation (FP) has to be proposed to all boys and men, whatever the age and the pathology, before the initiation of cancer treatment.
- Sperm cryopreservation is the most effective method of FP in men and postpubertal adolescents.
- When sperm collection cannot be obtained by masturbation, electroejaculation or surgical sperm extraction may be performed.
- Improvements in assisted reproductive techniques now offer real chances of fatherhood, even in case of very low sperm count.
- In adolescent, pubertal stage is not associated with the onset of spermatogenesis.

FP in boys

- Currently, all FP procedures available in prepubertal boys remain experimental.
- After testicular sperm extraction, gametes can be preserved as spermatogonial stem cell suspension or as testicular tissue.
- Different options for using cryopreserved testicular tissue are experimental and could be:
 - Testicular tissue grafting.
 - Spermatogonial stem cell injection: introduction of a testicular cell suspension containing spermatogonial stem cells through the efferent duct in the rete testis.
 - *In vitro* spermatogenesis derived from spermatogonial stem cells, isolated from the cryopreserved testicular tissue.

FP in girls & women

- The effect of gonadotropin-releasing hormone analogues to suppress ovarian function during chemotherapy is still controversial and not recommended as an only FP technique.
- The most established FP technique is oocyte or/and embryo cryopreservation after controlled ovarian hyperstimulation.
- Ovarian tissue cryopreservation is a promising FP technique. It is the only available technique for prepubertal girl. After grafting, this method allowed restoration of both endocrine and exocrine ovarian function. However, the risk of reintroducing malignant cells after grafting represents a major concern.
- Retrieval of immature oocytes followed by their *in vitro* maturation and vitrification may be interesting in emergency and/or when controlled ovarian hyperstimulation is contraindicated.
- Although ovarian tissue cryopreservation and *in vitro* maturation are very promising, these techniques are still experimental. Therefore, an association between these two methods should be proposed whenever it is possible.
- Artificial ovary, *in vitro* folliculogenesis from primordial oocytes or derived from pluripotent stem cells are new techniques under development.
- New molecules are under development to decrease, *in vivo*, the gonadotoxicity of treatments.

Conclusion

- Oncofertility counseling is now part of the management of cancer occurring in young patients. Established and experimental methods of FP are now available. However, the lack of information of oncologists account for the insufficient number of young cancer patients referred to specialist in reproductive medicine.

References

Papers of special note have been highlighted as:
•• of considerable interest

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA. Cancer J. Clin.* 65(1), 5–29 (2015).
- 2 ISFP Practice Committee, Kim SS, Donnez J *et al.* Recommendations for fertility preservation in patients with lymphoma, leukemia, and breast cancer. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29(6), 465–468 (2012).
- 3 Ethics Committee of American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation and reproduction in patients facing gonadotoxic therapies: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 100(5), 1224–1231 (2013).

- **Latest recommendation from the American Society for Reproductive Medicine society.**
- 4 Loren AW, Mangu PB, Beck LN *et al.* Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J. Clin. Oncol.* 31(19), 2500–2510 (2013).
- **Latest recommendation from the American Society of Clinical Oncology society.**
- 5 Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Fertility preservation during cancer treatment: clinical guidelines. *Cancer Manag. Res.* 6, 105–117 (2014).
- 6 Williams DH, Karpman E, Sander JC, Spiess PE, Pisters LL, Lipshultz LI. Pretreatment semen parameters in men with cancer. *J. Urol.* 181(2), 736–740 (2009).
- 7 Van Casteren NJ, Boellaard WPA, Romijn JC, Dohle GR. Gonadal dysfunction in male cancer patients before cytotoxic treatment. *Int. J. Androl.* 33(1), 73–79 (2010).
- 8 Wallace WHB, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol.* 6(4), 209–218 (2005).
- 9 Tournaye H, Dohle GR, Barratt CLR. Fertility preservation in men with cancer. *Lancet* 384(9950), 1295–1301 (2014).
- 10 Oosterhuis BE, Goodwin T, Kiernan M, Hudson MM, Dahl GV. Concerns about infertility risks among pediatric oncology patients and their parents. *Pediatr. Blood Cancer* 50(1), 85–89 (2008).
- 11 Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 172(4382), 767–768 (1953).
- 12 Horne G, Atkinson AD, Pease EHE, Logue JP, Brison DR, Lieberman BA. Live birth with sperm cryopreserved for 21 years prior to cancer treatment: case report. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 19(6), 1448–1449 (2004).
- 13 Morris ID. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int. J. Androl.* 25(5), 255–261 (2002).
- 14 Nangia AK, Krieg SA, Kim SS. Clinical guidelines for sperm cryopreservation in cancer patients. *Fertil. Steril.* 100(5), 1203–1209 (2013).
- 15 Berookhim BM, Mulhall JP. Outcomes of operative sperm retrieval strategies for fertility preservation among males scheduled to undergo cancer treatment. *Fertil. Steril.* 101(3), 805–811 (2014).
- 16 Bizet P, Saïas-Magnan J, Jouve E *et al.* Sperm cryopreservation before cancer treatment: a 15-year monocentric experience. *Reprod. Biomed. Online* 24(3), 321–330 (2012).
- 17 AbdelHafez F, Bedaiwy M, El-Nashar SA, Sabanegh E, Desai N. Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. *Hum. Reprod. Update* 15(2), 153–164 (2009).
- 18 Stein A, Shufaro Y, Hadar S, Fisch B, Pinkas H. Successful use of the Cryolock device for cryopreservation of scarce human ejaculate and testicular spermatozoa. *Andrology* 3(2), 220–224 (2015).
- 19 Nysom K, Pedersen JL, Jørgensen M *et al.* Spermatouria in two normal boys without other signs of puberty. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 83(5), 520–521 (1994).
- 20 Daudin M, Rives N, Walschaerts M *et al.* Sperm cryopreservation in adolescents and young adults with cancer: results of the French national sperm banking network (CECOS). *Fertil. Steril.* 103(2), 478–486.e1 (2015).
- 21 Hagenäs I, Jørgensen N, Rechnitzer C *et al.* Clinical and biochemical correlates of successful semen collection for cryopreservation from 12–18-year-old patients: a single-center study of 86 adolescents. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 25(8), 2031–2038 (2010).
- 22 Bahadur G, Ling KLE, Hart R *et al.* Semen quality and cryopreservation in adolescent cancer patients. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 17(12), 3157–3161 (2002).
- 23 Laron Z. Age at first ejaculation (spermarche)-the overlooked milestone in male development. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 7(3), 256–257 (2010).
- 24 Adank MC, van Dorp W, Smit M *et al.* Electroejaculation as a method of fertility preservation in boys diagnosed with cancer: a single-center experience and review of the literature. *Fertil. Steril.* 102(1), 199–205.e1 (2014).
- 25 Gat I, Toren A, Hourvitz A *et al.* Sperm preservation by electroejaculation in adolescent cancer patients. *Pediatr. Blood Cancer* 61(2), 286–290 (2014).
- 26 Goossens E, Van Saen D, Tournaye H. Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: from research to clinic. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 28(4), 897–907 (2013).
- 27 Hayashi Y, Saitou M, Yamanaka S. Germline development from human pluripotent stem cells toward disease modeling of infertility. *Fertil. Steril.* 97(6), 1250–1259 (2012).
- 28 Poels J, Van Langendonck A, Many M-C, Wese F-X, Wyns C. Vitrification preserves proliferation capacity in human spermatogonia. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 28(3), 578–589 (2013).
- 29 Goossens E, Geens M, De Block G, Tournaye H. Spermatogonial survival in long-term human prepubertal xenografts. *Fertil. Steril.* 90(5), 2019–2022 (2008).
- 30 Van Saen D, Gies I, De Schepper J, Tournaye H, Goossens E. Can pubertal boys with Klinefelter syndrome benefit from spermatogonial stem cell banking? *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 27(2), 323–330 (2012).
- 31 Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N *et al.* Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 17(12), 3039–3045 (2002).
- 32 Nakai M, Kaneko H, Somfai T *et al.* Production of viable piglets for the first time using sperm derived from ectopic testicular xenografts. *Reprod. Camb. Engl.* 139(2), 331–335 (2010).
- 33 Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91(24), 11298–11302 (1994).
- 34 Goossens E, Frederickx V, De Block G, Van Steirteghem AC, Tournaye H. Reproductive capacity of sperm obtained after germ cell transplantation in a mouse model. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 18(9), 1874–1880 (2003).
- 35 Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F *et al.* Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell* 11(5), 715–726 (2012).
- 36 Sadri-Ardekani H, Akhondi MA, van der Veen F, Repping S, van Pelt AMM. *In vitro* propagation of human prepubertal spermatogonial stem cells. *JAMA* 305(23), 2416–2418 (2011).
- 37 Geens M, Goossens E, Tournaye H. Cell selection by selective matrix adhesion is not sufficiently efficient for complete malignant cell depletion from contaminated human testicular cell suspensions. *Fertil. Steril.* 95(2), 787–791 (2011).
- 38 Sato T, Katagiri K, Gohbara A *et al.* *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 471(7339), 504–507 (2011).
- 39 Mahmoud H. Concise review: spermatogenesis in an artificial three-dimensional system. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30(11), 2355–2360 (2012).
- 40 Irie N, Weinberger L, Tang WWC *et al.* SOX17 Is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell* 160(1–2), 253–268 (2015).
- 41 Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Langendonck AV, Demylle D, Dolmans

- M-M. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum. Reprod. Update* 12(5), 519–535 (2006).
- 42 Roness H, Kalich-Philosoph L, Meirrow D. Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: possible roles for hormonal and non-hormonal attenuating agents. *Hum. Reprod. Update* 20(5), 759–774 (2014).
- **An excellent review with all developed molecules to reduce, *in vivo*, ovarian damages.**
- 43 Meirrow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WHB. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clin. Obstet. Gynecol.* 53(4), 727–739 (2010).
- 44 Sklar CA, Mertens AC, Mitby P *et al.* Premature menopause in survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J. Natl Cancer Inst.* 98(13), 890–896 (2006).
- 45 Anderson RA, Wallace WHB. Antimüllerian hormone, the assessment of the ovarian reserve, and the reproductive outcome of the young patient with cancer. *Fertil. Steril.* 99(6), 1469–1475 (2013).
- 46 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. *J. Ovarian Res.* 7, 69 (2014).
- 47 Ataya K, Rao LV, Lawrence E, Kimmel R. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide-induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. *Biol. Reprod.* 52(2), 365–372 (1995).
- 48 Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr. Rev.* 30(6), 624–712 (2009).
- 49 Meirrow D, Dor J, Kaufman B *et al.* Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 22(6), 1626–1633 (2007).
- 50 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. *Oncologist* 12(9), 1044–1054 (2007).
- 51 Hasky N, Uri-Belapolsky S, Goldberg K *et al.* Gonadotrophin-releasing hormone agonists for fertility preservation: unraveling the enigma? *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 30(5), 1089–1101 (2015).
- 52 Moore HCF, Unger JM, Phillips K-A *et al.* Goserelin for ovarian protection during breast-cancer adjuvant chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 372(10), 923–932 (2015).
- 53 Von Wolff M, Montag M, Dittrich R, Denschlag D, Nawroth F, Lawrenz B. Fertility preservation in women – a practical guide to preservation techniques and therapeutic strategies in breast cancer, Hodgkin’s lymphoma and borderline ovarian tumours by the fertility preservation network FertiPROTEKT. *Arch. Gynecol. Obstet.* 284(2), 427–435 (2011).
- 54 Ronn R, Holzer HEG. Oncofertility in Canada: gonadal protection and fertility-sparing strategies. *Curr. Oncol.* 20(6), e602–e607 (2013).
- 55 Cobo A, Serra V, Garrido N, Olmo I, Pellicer A, Remohí J. Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes. *Fertil. Steril.* 102(4), 1006–1015.e4 (2014).
- 56 Li Z, Wang YA, Ledger W, Edgar DH, Sullivan EA. Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 29(12), 2794–2801 (2014).
- 57 AbdelHafez FF, Desai N, Abou-Setta AM, Falcone T, Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* 20(2), 209–222 (2010).
- 58 Von Wolff M, Thaler CJ, Frambach T *et al.* Ovarian stimulation to cryopreserve fertilized oocytes in cancer patients can be started in the luteal phase. *Fertil. Steril.* 92(4), 1360–1365 (2009).
- 59 Turan V, Bedoschi G, Moy F, Oktay K. Safety and feasibility of performing two consecutive ovarian stimulation cycles with the use of letrozole-gonadotropin protocol for fertility preservation in breast cancer patients. *Fertil. Steril.* 100(6), 1681–1685.e1 (2013).
- 60 Oktay K, Hourvitz A, Sahin G *et al.* Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91(10), 3885–3890 (2006).
- 61 Meirrow D, Raanani H, Maman E *et al.* Tamoxifen co-administration during controlled ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilization in breast cancer patients increases the safety of fertility-preservation treatment strategies. *Fertil. Steril.* 102(2), 488–495.e3 (2014).
- 62 Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil. Steril.* 99(1), 37–43 (2013).
- 63 Cil AP, Bang H, Oktay K. Age-specific probability of live birth with oocyte cryopreservation: an individual patient data meta-analysis. *Fertil. Steril.* 100(2), 492–499.e3 (2013).
- 64 Yang D, Brown SE, Nguyen K, Reddy V, Brubaker C, Winslow KL. Live birth after the transfer of human embryos developed from cryopreserved oocytes harvested before cancer treatment. *Fertil. Steril.* 87(6), 1469.e1–e4 (2007).
- 65 Porcu E, Venturoli S, Damiano G *et al.* Healthy twins delivered after oocyte cryopreservation and bilateral ovariectomy for ovarian cancer. *Reprod. Biomed. Online* 17(2), 265–267 (2008).
- 66 Kim MK, Lee DR, Han JE *et al.* Live birth with vitrified-warmed oocytes of a chronic myeloid leukemia patient nine years after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28(12), 1167–1170 (2011).
- 67 Garcia-Velasco JA, Domingo J, Cobo A, Martínez M, Carmona L, Pellicer A. Five years’ experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. *Fertil. Steril.* 99(7), 1994–1999 (2013).
- 68 Alvarez M, Solé M, Devesa M *et al.* Live birth using vitrified – warmed oocytes in invasive ovarian cancer: case report and literature review. *Reprod. Biomed. Online* 28(6), 663–668 (2014).
- 69 Da Motta ELA, Bonavita M, Alegretti JR, Chehin M, Serafini P. Live birth after 6 years of oocyte vitrification in a survivor with breast cancer. *J. Assist. Reprod. Genet.* 31(10), 1397–1400 (2014).
- 70 Sánchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V *et al.* Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil. Steril.* 93(1), 268.e11–13 (2010).
- 71 Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 26(7), 1768–1774 (2011).
- 72 Maman E, Meirrow D, Brengauz M, Raanani H, Dor J, Hourvitz A. Luteal Phase oocyte retrieval and *in vitro* maturation is an optional procedure for urgent fertility preservation. *Fertil. Steril.* 95(1), 64–67 (2011).
- 73 Chian R-C, Huang JYJ, Gilbert L *et al.* Obstetric outcomes following vitrification of *in vitro* and *in vivo* matured oocytes. *Fertil. Steril.* 91(6), 2391–2398 (2009).

- 74 Grynberg M, El Hachem H, de Bantel A, Benard J, le Parco S, Fanchin R. *In vitro* maturation of oocytes: uncommon indications. *Fertil. Steril.* 99(5), 1182–1188 (2013).
- 75 Fasano G, Moffa F, Dechène J, Englert Y, Demeestere I. Vitrification of *in vitro* matured oocytes collected from antral follicles at the time of ovarian tissue cryopreservation. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9, 150 (2011).
- 76 Prasath EB, Chan MLH, Wong WHW *et al.* First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from *in vitro* matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 29(2), 276–278 (2014).
- 77 Fadini R, Mignini Renzini M, Guarnieri T *et al.* 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. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 27(12), 3601–3608 (2012).
- 78 Plushch G, Schneider E, Schneider T *et al.* *In vitro* maturation of oocytes is not associated with altered deoxyribonucleic acid methylation patterns in children from *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.* 103(3), 720–727 (2015).
- 79 Gremeau A-S, Andreadis N, Fatum M *et al.* *In vitro* maturation or *in vitro* fertilization for women with polycystic ovaries? A case–control study of 194 treatment cycles. *Fertil. Steril.* 98(2), 355–360 (2012).
- 80 Yeo CX, Gilchrist RB, Thompson JG, Lane M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 23(1), 67–73 (2008).
- 81 Albuz FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG, Gilchrist RB. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 25(12), 2999–3011 (2010).
- 82 De Vos M, Smitz J, Woodruff TK. Fertility preservation in women with cancer. *Lancet* 384(9950), 1302–1310 (2014).
- 83 Schmidt KT, Nyboe Andersen A, Greve T, Ernst E, Loft A, Yding Andersen C. Fertility in cancer patients after cryopreservation of one ovary. *Reprod. Biomed. Online* 26(3), 272–279 (2013).
- 84 Donnez J, Dolmans M-M. Transplantation of ovarian tissue. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 28(8), 1188–1197 (2014).
- 85 Donnez J, Dolmans M-M, Pellicer A *et al.* Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil. Steril.* 99(6), 1503–1513 (2013).
- 86 Sauvat F, Bouilly J, Capito C *et al.* Ovarian function is restored after grafting of cryopreserved immature ovary in ewes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27(4), 1511–1518 (2013).
- 87 Poirot C, Abirached F, Prades M, Coussieu C, Bernaudin F, Piver P. Induction of puberty by autograft of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 379(9815), 588 (2012).
- 88 Kim SS. Assessment of long term endocrine function after transplantation of frozen-thawed human ovarian tissue to the heterotopic site: 10 year longitudinal follow-up study. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29(6), 489–493 (2012).
- 89 Amorim CA, Jacobs S, Devireddy RV *et al.* Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 28(8), 2146–2156 (2013).
- 90 Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodríguez B *et al.* Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertil. Steril.* 101(3), 775–784 (2014).
- 91 Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N *et al.* Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110(43), 17474–17479 (2013).
- 92 Suzuki N, Yoshioka N, Takae S *et al.* Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 30(3), 608–615 (2015).
- 93 Gavish Z, Peer G, Roness H, Cohen Y, Meirou D. Follicle activation and “burn-out” contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 30(4), 1003 (2015).
- 94 Dolmans M-M, Luyckx V, Donnez J, Andersen CY, Greve T. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertil. Steril.* 99(6), 1514–1522 (2013).
- 95 Donnez J, Dolmans M-M. Fertility preservation in women. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9(12), 735–749 (2013).
- 96 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* 99(12), e249–e252 (2014).
- 97 Vanacker J, Luyckx V, Dolmans M-M *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* 33(26), 6079–6085 (2012).
- 98 Luyckx V, Dolmans M-M, Vanacker J, Scalerio SR, Donnez J, Amorim CA. First step in developing a 3D biodegradable fibrin scaffold for an artificial ovary. *J. Ovarian Res.* 6(1), 83 (2013).
- 99 Luyckx V, Dolmans M-M, Vanacker 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.* 101(4), 1149–1156 (2014).
- 100 Eppig JJ, O’Brien MJ. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol. Reprod.* 54(1), 197–207 (1996).
- 101 O’Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol. Reprod.* 68(5), 1682–1686 (2003).
- 102 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. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 23(5), 1151–1158 (2008).
- 103 Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertil. Steril.* 99(6), 1523–1533 (2013).
- 104 Anderson RA, McLaughlin M, Wallace WHB, Albertini DF, Telfer EE. The immature human ovary shows loss of abnormal follicles and increasing follicle developmental competence through childhood and adolescence. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 29(1), 97–106 (2014).
- 105 Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428(6979), 145–150 (2004).
- 106 White YAR, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat. Med.* 18(3), 413–421 (2012).
- 107 Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. Offspring from oocytes derived from *in vitro* primordial

- germ cell-like cells in mice. *Science* 338(6109), 971–975 (2012).
- 108 Dunlop CE, Telfer EE, Anderson RA. Ovarian stem cells – potential roles in infertility treatment and fertility preservation. *Maturitas* 76(3), 279–283 (2013).
- 109 Brännström M, Johannesson L, Bokström H *et al.* Livebirth after uterus transplantation. *Lancet* 385(9968), 607–616 (2015).
- 110 Brännström M, Johannesson L, Dahm-Kähler P *et al.* First clinical uterus transplantation trial: a six-month report. *Fertil. Steril.* 101(5), 1228–1236 (2014).
- 111 Farrell RM, Falcone T. Uterine transplant: new medical and ethical considerations. *Lancet* 385(9968), 581–582 (2015).
- 112 Hellström M, El-Akouri RR, Sjöhlom C *et al.* Towards the development of a bioengineered uterus: comparison of different protocols for rat uterus decellularization. *Acta Biomater.* 10(12), 5034–5042 (2014).
- 113 Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A *et al.* Cyclophosphamide triggers follicle activation and “burnout” AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Sci. Transl. Med.* 5(185), 185ra62 (2013).
- 114 Kaya H, Desdicigioglu R, Sezik M *et al.* Does sphingosine-1-phosphate have a protective effect on cyclophosphamide- and irradiation-induced ovarian damage in the rat model? *Fertil. Steril.* 89(3), 732–735 (2008).
- 115 Zelinski MB, Murphy MK, Lawson MS *et al.* *In vivo* delivery of FTY720 prevents radiation-induced ovarian failure and infertility in adult female nonhuman primates. *Fertil. Steril.* 95(4), 1440–1445. 1–7 (2011).
- 116 Gonfloni S, Di Tella L, Caldarola S *et al.* Inhibition of the c-Abl-TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death. *Nat. Med.* 15(10), 1179–1185 (2009).
- 117 Ochalski ME, Shuttleworth JJ, Chu T, Orwig KE. Thalidomide treatment attenuates chemotherapy-induced gonadal toxicity. *Fertil. Steril.* 95(2), 819–822 (2011).
- 118 Ting AY, Petroff BK. Tamoxifen decreases ovarian follicular loss from experimental toxicant DMBA and chemotherapy agents cyclophosphamide and doxorubicin in the rat. *J. Assist. Reprod. Genet.* 27(11), 591–597 (2010).
- 119 Mahran YF, El-Demerdash E, Nada AS, Ali AA, Abdel-Naim AB. Insights into the protective mechanisms of tamoxifen in radiotherapy-induced ovarian follicular loss: impact on insulin-like growth factor 1. *Endocrinology* 154(10), 3888–3899 (2013).
- 120 Ahn RW, Barrett SL, Raja MR *et al.* Nano-encapsulation of arsenic trioxide enhances efficacy against murine lymphoma model while minimizing its impact on ovarian reserve *in vitro* and *in vivo*. *PLoS ONE* 8(3), e58491 (2013).
- 121 Linkeviciute A, Boniolo G, Chiavari L, Peccatori FA. Fertility preservation in cancer patients: the global framework. *Cancer Treat. Rev.* 40(8), 1019–1027 (2014).
- 122 Lee SJ, Schover LR, Partridge AH *et al.* American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J. Clin. Oncol.* (18), 2917–2931 (2006).

III. Annexe 3

First mutation in the FSHR cytoplasmic tail identified in a non-pregnant woman with spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome

Justine Hugon-Rodin†, Charlotte Sonigo2†, Anne Gompel, Catherine Dodé, Michael Grynberg, Nadine Binart, and Isabelle Beau

BMC Medical Genetics , Avril 2017

CASE REPORT

Open Access



First mutation in the *FSHR* cytoplasmic tail identified in a non-pregnant woman with spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome

Justine Hugon-Rodin^{1†}, Charlotte Sonigo^{2,3†}, Anne Gompel¹, Catherine Dodé⁴, Michael Grynberg², Nadine Binart³ and Isabelle Beau^{3*}

Abstract

Background: Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome (sOHSS) is a rare event occurring mostly during natural pregnancy. Among described etiologies, some activating mutations of *FSH receptor (FSHR)* have been identified.

Case presentation: We report hereby the case of a non-pregnant women with three episodes of sOHSS. Hormonal evaluation was normal and no pituitary adenoma was detected. However, genetic analysis identified a novel heterozygous *FSHR* mutation (c.1901 G > A). This R634H mutation is the first described in the cytoplasmic tail of the receptor. Functional analysis failed to reveal constitutive activity of the mutant but a decreased cAMP production in response to FSH. The weak activity of this mutant is correlated with a markedly reduced cell surface expression.

Conclusion: Pathophysiology of non gestationnal sOHSS is still ill established. The molecular characterization of this new mutant indicates that it might not be at play. Therefore, further investigations are needed to improve knowledge of the molecular mechanism of this syndrome.

Keywords: *FSHR*, Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome, Mutation, cAMP

Background

Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) is an iatrogenic complication of supraphysiological ovulation induction in infertile patients. Evidence indicates that human chorionic gonadotrophin (hCG) plays a crucial role in the pathophysiology of this condition [1]. OHSS is characterized by ovarian enlargement due to multiple cysts together with abdominal distension. The pathogenesis of OHSS results in part from the production of several cytokines, probably enhanced by hCG, administered for final follicular maturation and further produced in case of pregnancy [2]. Clinical presentation is similar in spontaneous OHSS (sOHSS), a rare event mostly reported after natural pregnancy. sOHSS may result

from high serum hCG levels encountered in multiple or molar pregnancies. However, Follicular Stimulating Hormone (FSH)-producing pituitary adenomas (FSHoma) or neuroendocrine tumors, activating mutations of the *FSH receptor (FSHR)*, and hypothyroidism may also constitute risky situations [3, 4]. Five activating *FSHR* mutants have already been described in pregnant patients with sOHSS [5–9]. These gain-of-function mutations increase the sensitivity to hCG and/or to thyroid-stimulating hormone (TSH). By contrast, an impairment of *FSHR* function may cause severe folliculogenesis disorders such as ovarian failure [10, 11]. In the present paper, we report a case of non-gestational sOHSS associated with a novel *FSHR* mutation.

Case presentation

A 26-year-old woman was referred for a medical treatment after 3 ovarian torsions. After spontaneous

* Correspondence: isabelle.beau@u-psud.fr

†Equal contributors

³Inserm U1185, Univ Paris-Sud, University Paris Saclay, Le Kremlin Bicêtre 94276, France

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



puberty, she had been naturally pregnant one time and after normal evolution, in particular without sOHSS, delivered one healthy baby. She used combined hormonal contraception (CHC) before and after pregnancy. Two years after the delivery, she was hospitalized 3 times in one year for pelvic pain. Laparoscopy was performed each time and showed torsions of adnexa with multicystic ovaries, while she used CHC. Finally, a right salpingo-oophorectomy revealed hemorrhagic infarction. One month later, pelvic ultrasonography revealed an enlarged 7x5 cm left ovary containing multiple cysts in the pelvis (Fig. 1a) confirmed by pelvic Magnetic Resonance Imaging (MRI) (Fig. 1b). After 6 months of treatment by gonadotropin-releasing hormone agonist, the size of left ovary was restored, without cysts. Etiologic assessment was performed during agonist treatment. Hormonal evaluation showed low serum estradiol (<43 pmol/L) and anti-Müllerian hormone (0.8 ng/mL) levels. Gonadotropin values were <0.5 UI/L for LH and 5 UI/L for FSH. Levels of prolactin, TSH, cortisol and androgens were in the normal range. No adenoma was detected on pituitary MRI. She reported that her mother who had two pregnancies never suffered from OHSS.

Materials and methods

DNA sequencing

Informed consent for DNA sequence analysis was obtained from the patient. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. All exons of the FSHR gene, together with intron-exon boundaries (around 10 pb) were sequenced using an automated sequencer (PGM life-technologies, AmpliSeq 3.4).

Construction of mutated FSHR

The mutation was introduced into the pSG5-hFSHR plasmid [12] by oligonucleotide-mediated mutagenesis using QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent). The construct was verified by Sanger method sequencing.

Cell culture and transfection

COS-7 cells were grown with 10% fetal bovine serum in DMEM-F12 medium supplemented with L-glutamine and penicillin-streptomycin at 37 °C in humidified air containing 5% CO₂. The cells were transfected with plasmids encoding the wild-type (WT) or mutated FSHR using the FuGENE 6 transfection reagent (Promega), according to the manufacturer's protocol.

The efficiency of transfection was assessed by western blot analysis. Cells were lysed and total extracts were loaded onto 7.5% SDS-polyacrylamide gels. After transferring proteins on nitrocellulose membranes, blots were probed with FSHR323 monoclonal antibody [12] and anti-actin (clone C4, Millipore) antibodies.

cAMP assay

Forty-eight hours after transfection, the intracellular accumulation of cyclic AMP (cAMP) was measured after incubation for 45 min with various concentrations of recombinant human FSH (Gonal-F°, Merck, France) using cAMP complete ELISA kit (Enzo Life Sciences).

Immunofluorescence and confocal microscopy

FSHR323 was used to study, by indirect immunofluorescence, FSHR expression in transfected COS-7 cells as described previously [13]. For non permeabilized conditions, the antibody was applied on living cells for 1 h (h) at 4 °C in PBS containing 1% BSA, and the cells were fixed for 15 min (min) in 3% formaldehyde. After saturation with PBS/1% BSA the cells were incubated for 1 h with AlexaFluor 555 labeled anti-mouse antibody.

In some experiments, the cells were permeabilized for 4 min with 0.2% triton in PBS and incubated with FSHR antibody for 2 h at room temperature and further proceeded as non permeabilized cells. The samples were mounted in DAPI Fluoromont G medium (Southern Biotech). Imaging was carried out on a SP8 Leica confocal microscope.

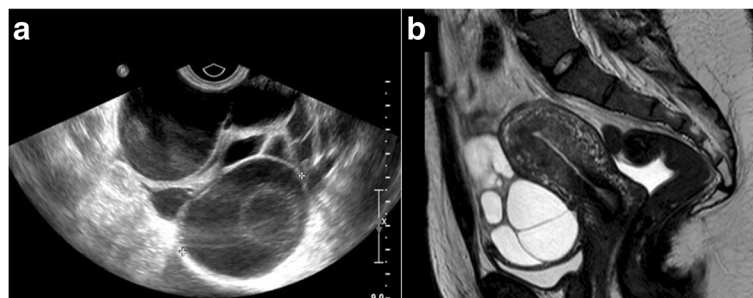


Fig. 1 Multiple ovarian cysts revealed in pelvic ultrasonography and MRI. Pelvic ultrasonography (a) revealed an enlarged 7x5 cm left ovary containing multiple cysts without fluid in the pelvis. This sagittal pelvic Magnetic Resonance Imaging (b) T2 weighted images showed a left multicystic ovary

Surface immunoprecipitation of wild type and mutated FSH receptors

Cell surface expression of the wild type and mutated FSHR was analyzed by immunoprecipitation as previously described [14]. Briefly, FSHR antibody was added to the cell surface for one hour at 37 °C. Receptor-antibody complexes were extracted, purified and analyzed by western-blot.

Statistical analysis

Data are expressed as means ± standard error of the means (SEM) and were analyzed with Prism software (GraphPad version 6.0) by using repeat measures ANOVA (Kruskal-Wallis test) to assess differences between groups followed by appropriated post-hoc comparisons (Dunn’s test). The p values lower than 0.05 were considered statistically significant. Experiments were performed a minimum of three times.

Results

Sequencing of *FSHR* gene revealed a heterozygous substitution of a guanine for an adenine in exon 10 (c.1901 G > A), resulting in the substitution of an arginine for histidine at position 634 of the protein (Fig. 2). The p.Arg634His variant (R634H) was referenced with allelic frequency of 0.000041 in the Exome Aggregation Consortium Browser Database. The Arginine 634, located at the beginning of the cytoplasmic tail, is highly conserved among species (Fig. 2a). *In silico* analysis revealed that p.Arg634His variant was predicted as “possibly damaging” and “deleterious” by Polyphen and SIFT respectively.

This variant was then introduced into an expression vector encoding the FSHR and was transiently transfected into COS-7 cells. The transfection efficiency of the WT and mutated FSHR, assessed by western blot, showed similar level of protein (Fig. 2b).

To evaluate the functional activity of the mutant, we first analyzed the basal production of cAMP by the WT and mutated FSHR. COS-7 cells transfected with expression vector encoding receptor were incubated in DMEM containing 0.5 mM IBMX and the intracellular accumulation of cAMP was quantified. No significant difference in basal cAMP production by cells expressing the wild-type or mutated receptor was observed (Fig. 3a). COS-7 cells expressing either WT or R634H FSHR were then incubated with increasing concentrations of FSH. A cAMP dose-dependent response to FSH was observed in all conditions, but the response of the mutated receptor to high doses of FSH was decreased as compared to the WT. After transfection of COS-7 cells with equal quantities of the WT and mutant FSHR expression vector, mimicking the situation of heterozygous mutation, the response to recombinant FSH was similar to that of the

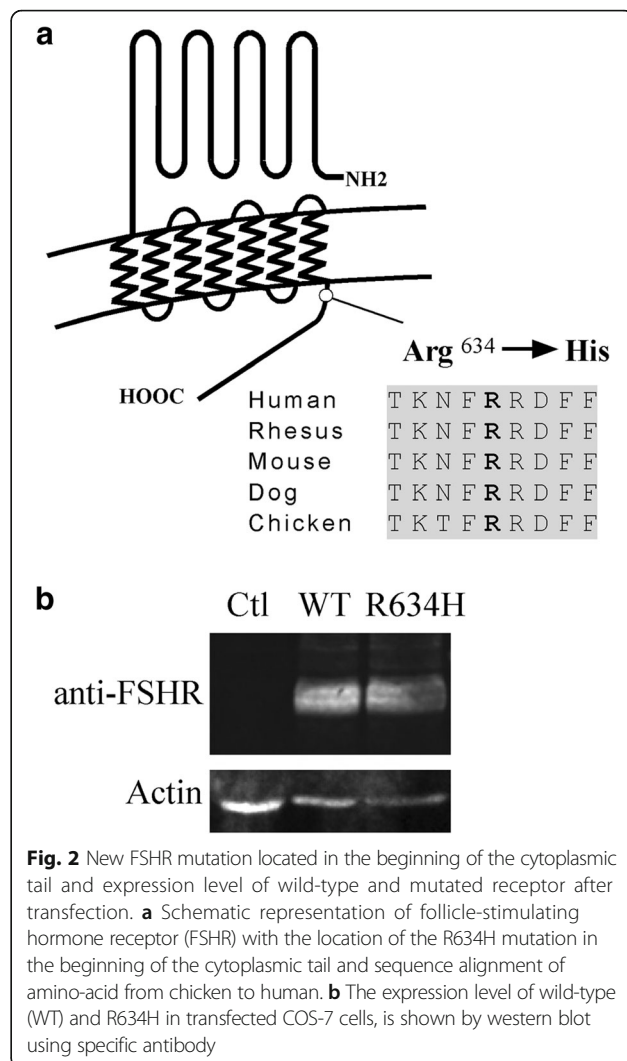


Fig. 2 New FSHR mutation located in the beginning of the cytoplasmic tail and expression level of wild-type and mutated receptor after transfection. **a** Schematic representation of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) with the location of the R634H mutation in the beginning of the cytoplasmic tail and sequence alignment of amino-acid from chicken to human. **b** The expression level of wild-type (WT) and R634H in transfected COS-7 cells, is shown by western blot using specific antibody

WT receptor alone (Fig. 3b). In the absence of difference of response with high doses of FSH, response to physiological doses (1–5 mUI/mL) was analyzed. No difference between WT and mutated receptors was detected (Fig. 3c). In order to evaluate whether the mutated R634H mutant became sensitive to other ligands, stimulation with recombinant hCG and TSH were assessed. No accumulation of cAMP was observed in both conditions (data not shown).

To assess the cell surface expression of the mutant, the transfected cells permeabilized or not permeabilized were incubated with FSHR323 antibody recognizing the ectodomain of FSHR. Confocal microscopy examination of permeabilized cells showed similar expression of WT and mutated receptors (Fig. 3d). Both WT and mutated receptors were observed at the cell surface in non-permeabilized cells, but the expression of the mutant was markedly reduced compared to the WT receptor (Fig. 3d). In order to quantify the WT and mutated

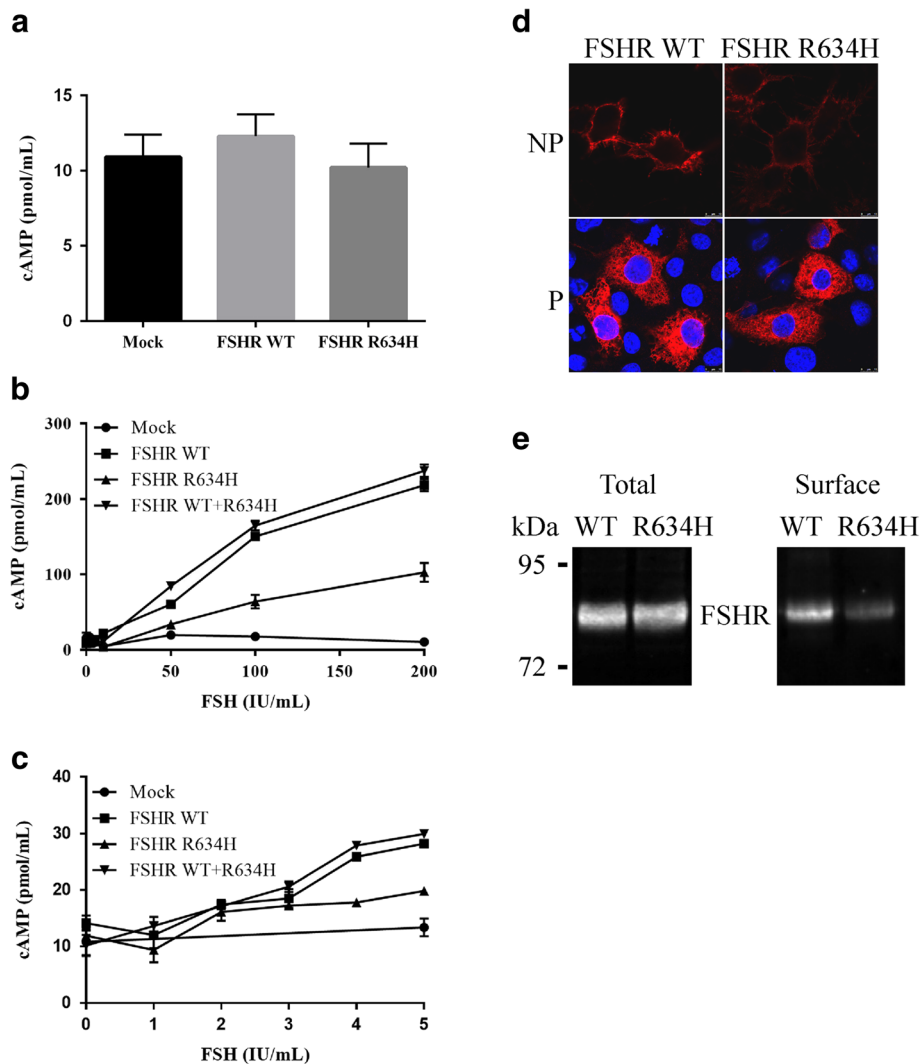


Fig. 3 Functional studies of the wild-type and mutant FSHR. COS-7 cells were transfected with empty (mock) or expression vector encoding WT and/or mutated receptor. COS-7 cells were transfected with empty (mock) or expression vector encoding WT and/or mutated receptor. **a** Cyclic AMP (cAMP) level observed in transfected cells in the absence of any hormonal stimulation. Graph represents the results of at least three separate experiments performed in duplicate conditions. **b** and **c** Transfected cells were incubated with increasing concentrations of human follicle-stimulating hormone (FSH) and the accumulation of cAMP was measured. Each graph represents the results (mean ± SEM) of at least two separate experiments. **d** Cell surface expression of WT and mutated FSHRs. Permeabilized (P) or nonpermeabilized (NP) transfected cells were incubated with the FSHR323 antibody. Confocal microscopy was used to study the cellular distribution of receptors. **e** The membrane expression of the FSHR R634H is decreased. COS-7 cells were transfected with WT or mutated FSHR. Immunoprecipitation of FSHR from total extract (total) or from cell surface (surface) was performed using FSHR323. Immunoprecipitated FSHR was analyzed by western-blotting. Size of the molecular mass is indicated

FSHR at the cell membrane, we performed surface immunoprecipitation experiments. The level of R634H was decreased by 60% as compared to the WT FSHR while we detected the same amount of the two receptors in the total extract (Fig. 3e).

Discussion and conclusion

Even though OHSS is mostly an iatrogenic complication, a consequence of hormonal stimulation in infertile patients [1], some cases may occur spontaneously, in particular during pregnancy [15]. Here, we report a case

of sOHSS, resulting in three adnexal torsion, in a non-pregnant woman with normal gonadotropins and thyroid hormones levels and without pituitary adenoma. In our knowledge, just two cases of ovarian torsion had been described. The first one had been described during an episode of thyroiditis, in a patient with an history of two previous episodes of sOHSS during her two pregnancies [16]. The second one occurred in a patient with ectopic hypersecretion of FSH by a pancreatic tumor [4]. Today, only 5 heterozygous activating *FSHR* mutations have been described [5–9]. The common feature of these

five mutations is that they have reduced specificity for FSH as they respond to increasing hCG levels that occur during normal pregnancy. Indeed, they become responsive to increasing hCG or TSH concentrations [5–9]. All of them are located either in transmembrane [5, 7–9] or in extracellular FSHR domain [6] and are associated with reduced specificity for FSH.

We described here the first mutation located in the FSHR cytoplasmic tail. The R634H residue belongs to the highly conserved BXXBB motif (where B represents a basic residue and X a non-basic residue) located in the receptor cytoplasmic tail [17]. When the mutant *FSHR* was transfected into COS-7 cells in the absence of ligand, no constitutive activation was observed. Moreover, there was a decrease in cAMP production after FSH administration compared to WT and surface cell expression was impaired. These results are in accordance with several studies evaluating the functional role of the cytoplasmic tail of FSHR and particularly the BXXBB motif [17–19]. Indeed, functional analysis revealed that the cytoplasmic-tail of FSHR plays an indispensable role in cell surface receptor trafficking [20] and BXXBB is particularly important for membrane expression [17, 18]. Moreover, we showed that in heterozygous condition, the response to recombinant FSH was similar to that of the WT receptor alone. In the same way, Zariñán et al. had reported that co-transfection of wild type FSHR with mutant FSHR in the BXXBB of the cytoplasmic tail showed dose-dependent inhibition in cAMP production with increasing amounts of mutant DNA and subsequently rescue of function by co-transfection with wild-type fragments suggesting oligomerization of FSHR [21].

We report, in a young patient suffering from recurrent and unexplained sOHSS, the first *FSHR* mutation located in the cytoplasmic tail of the receptor. However, contrasting with the phenotype, functional analysis demonstrated that this mutant does not exhibit any constitutive activity. Similarly another reported FSHR variant, M512L, also found in non-pregnant woman with sOHSS, did not demonstrated her involvement in this pathology [22]. Nevertheless, both case reports highlight the importance of performing functional analysis to ensure that new *FSHR* mutations are actually at play in sOHSS. Further investigations and genetic analysis will be needed to understand the pathophysiology of sOHSS.

Abbreviations

cAMP: cyclic Adenosine MonoPhosphate; CHC: Combined hormonal contraception; DNA: Deoxyribo nucleic acid; FSH: Follicular stimulating hormone; FSHoma: FSH-producing pituitary adenomas; FSHR: FSH receptor; hCG: Human chorionic gonadotrophin; LH: Luteinizing hormone; MRI: Magnetic resonance imaging; OHSS: Ovarian hyperstimulation syndrome; SEM: Standard error of the means; sOHSS: Spontaneous OHSS; TSH: Thyroid-Stimulating hormone; WT: Wild-Type

Acknowledgements

We thank V. Nicolas for assistance in confocal microscopy (Plate-forme d'imagerie cellulaire-MIPSIT, University Paris-Sud).

Funding

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

IB, NB and CS designed the study; CD performed the genetic analyses; IB and CS carried out the experiments; JH, CS, NB and IB wrote the manuscript; and JH, AG, CS and MG managed the patient. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Written informed consent for the publication of these details was obtained from the patient.

Ethics approval and consent to participate

Research procedures were conducted in accordance with institutional guidelines and the Declaration of Helsinki. Informed consent for DNA sequence analysis was obtained from the patient.

Publisher's Note

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

Author details

¹Gynecology Endocrinology Unit, Port-Royal Cochin Hospital, University Paris Descartes, Paris, France. ²Department of Reproductive Medicine and Fertility Preservation, Jean-Verdier Hospital, Bondy, France. ³Inserm U1185, Univ Paris-Sud, University Paris Saclay, Le Kremlin Bicêtre 94276, France. ⁴Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Cochin Hospital, Paris, France.

Received: 24 October 2016 Accepted: 14 April 2017

Published online: 26 April 2017

References

- Fiedler K, Ezcurra D. Predicting and preventing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): the need for individualized not standardized treatment. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2012;10:32.
- Boothroyd C, Karia S, Andreadis N, Rombauts L, Johnson N, Chapman M, et al. Consensus statement on prevention and detection of ovarian hyperstimulation syndrome. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2015;55:523–34.
- Panagiotopoulou N, Byers H, Newman WG, Bhatia K. Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome: case report, pathophysiological classification and diagnostic algorithm. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;169:143–8.
- Miras AD, Mogford JT, Wright J, Mendoza NN, Xekouki P, Lakhani A, et al. Ovarian hyperstimulation from ectopic hypersecretion of follicle stimulating hormone. *Lancet Lond Engl*. 2015;385:392.
- Smits G, Olatunbosun O, Delbaere A, Pierson R, Vassart G, Costagliola S. Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor. *N Engl J Med*. 2003;349:760–6.
- De Leener A, Caltabiano G, Erkan S, Idil M, Vassart G, Pardo L, et al. Identification of the first germline mutation in the extracellular domain of the follitropin receptor responsible for spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Mutat*. 2008;29:91–8.
- De Leener A, Montanelli L, Van Durme J, Chae H, Smits G, Vassart G, et al. Presence and absence of follicle-stimulating hormone receptor mutations provide some insights into spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome pathophysiology. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:555–62.
- Vasseur C, Rodien P, Beau I, Desroches A, Gérard C, de Poncheville L, et al. A chorionic gonadotropin-sensitive mutation in the follicle-stimulating hormone

- receptor as a cause of familial gestational spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *N Engl J Med*. 2003;349:753–9.
9. Montanelli L, Delbaere A, Di Carlo C, Nappi C, Smits G, Vassart G, et al. A mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:1255–8.
 10. Desai SS, Roy BS, Mahale SD. Mutations and polymorphisms in FSH receptor: functional implications in human reproduction. *Reprod Camb Engl*. 2013;146: R235–248.
 11. Bramble MS, Goldstein EH, Lipson A, Ngun T, Eskin A, Gosschalk JE, et al. A novel follicle-stimulating hormone receptor mutation causing primary ovarian failure: a fertility application of whole exome sequencing. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2016;31:905–14.
 12. Vannier B, Loosfelt H, Meduri G, Pichon C, Milgrom E. Anti-human FSH receptor monoclonal antibodies: immunochemical and immunocytochemical characterization of the receptor. *Biochemistry (Mosc)*. 1996;35:1358–66.
 13. Beau I, Touraine P, Meduri G, Gougeon A, Desroches A, Matuchansky C, et al. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *J Clin Invest*. 1998;102:1352–9.
 14. Beau I, Groyer-Picard MT, Le Bivic A, Vannier B, Loosfelt H, Milgrom E, et al. The basolateral localization signal of the follicle-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem*. 1998;273:18610–6.
 15. Siegel ET, Kim H-G, Nishimoto HK, Layman LC. The molecular basis of impaired follicle-stimulating hormone action: evidence from human mutations and mouse models. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif*. 2013;20:211–33.
 16. Di Carlo C, Savoia F, Fabozzi A, Gargano V, Nappi C. A case of ovarian torsion in a patient carrier of a FSH receptor gene mutation previously affected by spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2015;31:105–8.
 17. Timossi C, Ortiz-Elizondo C, Pineda DB, Dias JA, Conn PM, Ulloa-Aguirre A. Functional significance of the BBXXB motif reversed present in the cytoplasmic domains of the human follicle-stimulating hormone receptor. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;223:17–26.
 18. Ulloa-Aguirre A, Uribe A, Zariñán T, Bustos-Jaimes I, Pérez-Solis MA, Dias JA. Role of the intracellular domains of the human FSH receptor in G(alphaS) protein coupling and receptor expression. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 260–262:153–62.
 19. Banerjee AA, Mahale SD. Role of the Extracellular and Intracellular Loops of Follicle-Stimulating Hormone Receptor in Its Function. *Front Endocrinol*. 2015;6:110.
 20. Duvernay MT, Zhou F, Wu G. A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J Biol Chem*. 2004;279:30741–50.
 21. Zariñán T, Perez-Solis MA, Maya-Núñez G, Casas-González P, Conn PM, Dias JA, et al. Dominant negative effects of human follicle-stimulating hormone receptor expression-deficient mutants on wild-type receptor cell surface expression. Rescue of oligomerization-dependent defective receptor expression by using cognate decoys. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;321:112–22.
 22. Uchida S, Uchida H, Maruyama T, Kajitani T, Oda H, Miyazaki K, et al. Molecular analysis of a mutated FSH receptor detected in a patient with spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *PLoS One*. 2013;8:e75478.

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



Titre : titre (en français) : Oncofertilité, impact des facteurs influençant la réserve ovarienne après chimiothérapie

Mots clés : AMH, Préservation de la fertilité, réserve ovarienne

Résumé : La chimiothérapie induit une baisse de la fertilité en exerçant une toxicité directe sur les ovaires entraînant une diminution du stock ovocytaire. Couramment utilisé dans le traitement du cancer du sein, le cyclophosphamide (Cy) est une des drogues reconnue comme la plus gonadotoxique. Récemment, il a été proposé que le Cy provoquait une déplétion folliculaire par une entrée en croissance massive des follicules au repos. L'Hormone Anti-Müllérienne (AMH) étant un des facteurs régulant la sortie des follicules primordiaux de la réserve ovarienne, nous avons émis l'hypothèse que cette hormone pourrait limiter la gonadotoxicité du Cy. Nous avons montré qu'un traitement par AMH recombinante chez des souris pubères traitées par Cy, permettait effectivement de limiter la déplétion folliculaire.

Sur le plan fondamental, nous avons mis en évidence que l'autophagie pouvait être un des mécanismes impliqués dans l'inhibition du recrutement folliculaire exercée par l'AMH. Enfin, la méthode de référence consistant à évaluer la réserve ovarienne chez la souris étant particulièrement longue et fastidieuse, nous avons développé une technique de comptage folliculaire automatisé en utilisant des méthodes d'intelligence artificielle, et plus particulièrement une approche de « deep learning».

Title : Oncofertility : impact of factors influencing ovarian reserve after chemotherapy

Keywords : AMH, fertility preservation, ovarian reserve

Abstract : Chemotherapy induces infertility by exerting a direct toxicity on the ovaries, resulting in a depletion of the follicular stockpile. Cyclophosphamide (Cy), widely used for breast cancer, is recognized as one of the most gonadotoxic agent. Recently, it has been proposed that Cy gives rise to follicular depletion by a massive growth of resting follicles which are then destroyed. Since Anti-Müllerian Hormone (AMH) is one of the factors regulating primordial follicles activation, we hypothesized that this hormone might limited Cy-induced gonadotoxicity. We have shown in pubertal mice that recombinant AMH injections are able to preserve primordial follicle loss Cy-induced and might improve fertility outcome after treatment.

In addition, we provide evidence that autophagy could be one of the mechanisms involved in the inhibition of follicular recruitment by AMH. At least, nowadays, the “gold standard” method of evaluating ovarian reserve in mouse is a process particularly time-consuming and tedious. We developed a new methodology of automatic primordial follicles detection and counting within mouse ovaries, using modern artificial intelligence methods, especially deep learning approach.

