

Nouvelle technologie pour la congélation de cortex ovarien: mise au point et application chez la souris Xavier Ferraretto

▶ To cite this version:

Xavier Ferraretto. Nouvelle technologie pour la congélation de cortex ovarien : mise au point et application chez la souris. Biologie de la reproduction. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2021. Français. NNT : 2021PA131042 . tel-03576444

HAL Id: tel-03576444 https://theses.hal.science/tel-03576444

Submitted on 16 Feb 2022

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. UNIVERSITE SORBONNE PARIS NORD ECOLE DOCTORALE GALILEE

DOCTORAT

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée par

M. Xavier FERRARETTO

Nouvelle technologie pour la congélation de cortex ovarien : mise au point et application chez la souris

Soutenue publiquement le 8 janvier 2021

Devant le jury composé de :

Mme le Professeur Catherine Poirot	Rapporteur
Mme le Docteur Catherine Le Visage	Rapporteur
Mme le Docteur Maëliss Peigné	Examinateu
Mme le Professeur Fani Anagnostou	Examinateu
Mme le Professeur Catherine Patrat	Directeur
Mme le Professeur Anne Meddahi-Pellé	Directeur

Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS) INSERM U1148 – Hôpital Bichat, Paris

"Mais pourquoi Papa ?"

...à mes deux garçons

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord Anne Meddahi-Pellé d'avoir encadré ce travail. Merci pour tes conseils avisés, ta confiance et ta bienveillance.

A Catherine Patrat qui au-delà de ce travail de thèse m'a accompagné depuis le début de mon internat en Biologie de la Reproduction. Merci pour tes remarques et conseils très précieux, mais aussi pour tout le reste...

Je remercie les membres du Jury, Catherine Poirot et Catherine Le Visage d'avoir accepté le rôle de rapporteur, ainsi que Fani Anagnostou et Maëliss Peigné pour avoir accepté de juger ce travail.

Un grand merci à Jessica pour m'avoir appris tant de choses pendant les premiers mois de ma thèse et pour ton soutien technique sans faille. A Rachida pour ton aide et les heures passées avec les souris et moi.

A toute l'équipe du LVTS... Tout d'abord merci à Didier Letourneur de m'avoir accueilli dans ton laboratoire pendant ces 4 années. A toute l'équipe 3, merci pour tous les bons moments passés ensemble. Une pensée particulière pour Soraya, Maya, Marisol, Bo, Marie-Noëlle, Fernanda, Jérome, Alina, Teresa et Camille. A Cédric pour ta bonne humeur et tes blagues toujours au rendez-vous. Mais aussi un grand merci à Liliane, Sébastien, Véronique, Graciela, sans oublier Oliver et Laure de la plateforme de pathologie de Bichat.

A toute l'équipe du laboratoire de Biologie de la Reproduction de Bichat, Marie-Astrid, Florence, Johanna, Sabrina B, Sabrina Y, Pauline, Marc, Yckobho, Goundo, Nathalie, Melissa, Elodie Christiane et Ghislaine. C'est un grand plaisir de travailler ou d'avoir travaillé avec vous au quotidien.

Merci à mes amis pour les moments de détentes en dehors de la thèse ou du travail.

A mes parents, ma grand-mère et mon frère pour avoir toujours été là pour me soutenir.

A Lea, Aurèle et Henri sources de motivation quotidienne et intarissable.

TABLE DES MATIERES

REVI	UE	DE LA LITTERATURE	11
١.	PR	ESERVATION DE LA FERTILITE FEMININE	12
Α.	(Cadre légal et recommandations	12
В.	I	Principales techniques	12
C.	/	Activité en France	13
Π.	٥v	AIRES, CORTEX OVARIEN	15
Α.	I	ovaire et ses composants	15
	1.	L'organogenèse et l'anatomie de l'ovaire	15
	2.	L'ovogenèse	16
	3.	La folliculogenèse	17
	4.	Le tissu ovarien	22
В.	I	e cortex ovarien dans la préservation de la fertilité	23
	1.	Contexte épidémiologique	23
	2.	Les indications de la congélation de cortex ovarien	23
	3.	Le prélèvement de tissu ovarien	25
	4.	La greffe du cortex ovarien	26
III.	LA	CRYOPRESERVATION DU CORTEX OVARIEN	28
Α.	I	es agents cryoprotecteurs	28
	1.	Les cryoprotecteurs pénétrants	28
	2.	Les cryoprotecteurs non-pénétrants	29
В.	I	es procédures de congélation	30
	1.	La congélation lente	30
	2.	La vitrification	32
C.	(Congélation du cortex ovarien	34
	1.	Congélation lente de cortex ovarien	34
	2.	Vitrification du cortex ovarien	35
	3.	Résultats après congélation du cortex ovarien	38
IV.	LES	S HYDROGELS	40
Α.	[Définition	40
В.	I	a synthèse	40
	1.	Les types de polymères utilisés	41
	2.	La formation de l'hydrogel	42
C.	/	Applications	44
	1.	Principales applications	44
	2.	Application en congélation	45

v.	CONCLUSION ET OBJECTIFS	48
PAR CRY	RTIE 1: DEXTRAN-BASED HYDROGEL AS A NEW TOOL FOR BALB/C 3T3 OPRESERVATION WITHOUT DIMETHYL SULFOXIDE	CELL 51
١.	INTRODUCTION	54
П.	MATERIALS AND METHODS	56
ш.	RESULTS	60
IV.	DISCUSSION	68
v.	CONCLUSION	70
PAR	RTIE 2 : CONGELATION LENTE D'OVAIRES DE SOURIS AVEC LE PSH500	73
١.	INTRODUCTION	74
П.	MATERIELS ET METHODES	76
A	. Synthèse de l'hydrogel : PSH ₅₀₀	76
	1. Réticulation du PSH ₅₀₀	76
	 Lavage et séchage du PSH₅₀₀ 	77
	3. Broyage du PSH ₅₀₀ et séparation de la poudre selon la granulométrie	78
	4. Rendement de synthèse	79
	5. Stérilisation de l'hydrogel	79
B.	. Expérimentation animale	79
	1. Prélèvement des ovaires de souris	79
	2. Congélations des ovaires de souris	82
	3. Décongélations des ovaires de souris	82
	4. Analyses histologiques des échantillons	83
	5. Acquisition d'une lame digitale	87
	6. Analyse statistique	87
III.	RESULTATS	88
A	. Rendement de la synthèse d'hydrogel	88
Β.	. Classification des follicules et analyse morphologique	89
C.	. Analyse de la vascularisation corticale	91
D	Analyse de l'apoptose cellulaire	93
IV.	DISCUSSION	95
v.	CONCLUSION	100
PAR	RTIE 3 : MODELE DE GREFFE HETEROTOPIQUE D'OVAIRES DE SOURIS	101
١.	INTRODUCTION	102
н.	MATERIELS ET METHODES	103
A	. Prélèvement des ovaires de souris en vue de greffe	103
B.	. Congélation et décongélation des ovaires de souris	105
C.	. Greffe des ovaires de souris	105

D.	Prélèvement des ovaires de souris après greffe 10			
E.	Classification des follicules et analyse morphologique			
ш.	RESULTATS	108		
A.	. Aspect macroscopique des ovaires après à 7 jours post greffe	108		
В.	3. Classification des follicules et anaylse histologique			
IV.	DISCUSSION	110		
v.	CONCLUSION	112		
CON	NCLUSION GENERALE	113		
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES				
	NEXES	133		

LISTE DES ABREVIATIONS

ABM : Agence de la BioMédecine
AMP : Assistance Médicale à la Procréation
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARS : Agence Régionale de Santé
CGP : cellules germinales primordiales
CNGOF : Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français
DM : dispositif médical
DMSO : diméthyl sulfoxyde
EG : éthylène glycol
ESHRE : European Society of Human Reproduction and Embryology
ICSI : intracytoplasmic sperm injection (injection intracytoplasmique de spermatozoïde)
INCa : Institut National du Cancer
PBS : phosphate buffered saline
PEG : poly(ethylène glycol)
PHRC : protocole hospitalier de recherche clinique
PSH ₄₀ : Hydrogel de dextrane de poids moléculaire de 40KDa
PSH ₇₀ : Hydrogel de dextrane de poids moléculaire de 70KDa
PSH ₅₀₀ : Hydrogel de dextrane de poids moléculaire de 500KDa
PrOH : propylène glycol (1,2-propanediol)
PF : préservation de la fertilité
rpm : rotations par minute
SD : semaine de développement
STMP : sodium trimétaphosphate
STTP : tripolyphosphate de sodium

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie de l'appareil génitale féminin d'après (A) une image coelioscopique et (B) un
schéma15
Figure 2 : Migration des cellules germinales primordiales (CGP)16
Figure 3 : Ovogenèse. GP = globule polaire17
Figure 4. Follicule primordial (A) et primaire (B)18
Figure 5 : Follicule secondaire
Figure 6 : Follicule tertiaire
Figure 7 : Représentation schématique de la folliculogenèse ovarienne
Figure 8 : Coupe histologique d'un ovaire humain entier
Figure 9 : Fragments de cortex ovarien après traitement au laboratoire de biologie de la reproduction
(d'après Fortin <i>et al.</i> 2019) ²⁸
Figure 10 : Exemple de greffe orthotopique de cortex ovarien réalisée par l'équipe de Jacques
Donnez
Figure 11 : Représentation schématique des hypothèses de Mazur et al.
Figure 12 : Aspect macroscopique d'une vitrification
Figure 13 : Descente en température contrôlée employée pour la congélation de cortex ovarien
humain (adapté de Rivas Leonel <i>et al.</i> ²⁷)
Figure 14 : Supports utilisées pour la vitirifcation de cortex ovarein
Figure 15 : Facteurs influençant le gonflement d'un hydrogel en milieu aqueux
Figure 16 : Structure chimique du dextrane
Figure 17 : Schéma d'un hydrogel réticulé (adapté de Laughter <i>et al. et</i> Zhu <i>et al.</i> ^{92,104})
Figure 18 : Principales applications des hydrogels
Figure 19: Size distribution of dextran-based hydrogel analysed using the Malvern Matersizer
Microplus laser diffractometer technique
Figure 20: Dextran-based hydrogel BALB/c 3T3 cell biocompatibility65
Figure 21: BALB/c 3T3 cell viability after cryopreservation in dextran-based hydrogel
Figure 22 : Déférentes étapes de la synthèse du PSH ₅₀₀ 76
Figure 23: Mécanisme de réticulation des polysaccharides par le STMP en milieu alcalin
Figure 24 : Lavage du PSH ₅₀₀
Figure 25 : Image de l'appareil génital des souris femelle
Figure 26 : (A) Image d'un ovaire avec son tissu adipeux et l'oviducte avant dissection, (B) image d'un
ovaire isolé après dissection sous loupe binoculaire
Figure 27 : Schéma récapitulatifs des différentes étapes de l'expérimentation animale

Figure 28 : Classification morphologiques des follicules ovariens de souris
Figure 29: Différentes granulométries d'hydrogel obtenues après synthèse
Figure 30 : Coloration hématoxyline éosine des ovaires de souris des groupes Fresh, Ref, DMEM,
PSH ₅₀₀ +DMSO et PSH ₅₀₀
Figure 31: Proportion de type de follicules des groupes Fresh, Ref et PSH ₅₀₀
Figure 32: Densité des follicules primordiaux intact (/mm ²) en fonction du groupe
Figure 33 : Marquage de la proteïne CD31
Figure 34 : Densité en vaisseau corticaux marqués par le CD31 (/mm ²) en fonction du groupe
Figure 35 : Marquage de la Caspase 3 clivée94
Figure 36 : Schéma récapitulatifs des différentes étapes du protocole de greffe hétérotopique
d'ovaire en fonction des groupes d'inclusion
Figure 37 : Différente étapes de prélèvement d'un ovaire de souris lors du protocole de greffe
hétérotopique
Figure 38 : Grilles d'évaluation permettant le suivi des souris après chirugie
Figure 39 : Différente étapes de prélèvement d'un ovaire de souris lors du protocole de greffe
hétérotopique
Figure 40 : Schéma de section de l'ovaire greffé avant fixation et inclusion en paraffine 107
Figure 41 : Aspect macroscopique des ovaires à 7 jours post-greffe108
Figure 42 : Coloration hématoxyline éosine d'ovaires de souris des groupes Sham, Ref et
PSH ₅₀₀ +DMSO
Figure 43 : Schéma d'intéraction de l'hydrogel avec cellules (B) et un tissu (B)
Figure 44 : Schéma récapitulatif des différentes hypothèses des mécanismes de cryoprotection du
PSH ₅₀₀ 116
Figure 45 : Eléments nécessaires à l'obtention du marquage CE pour un dispositif médical (DM) de
classe IIa

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Préservation de la fertilité en France en 2018, conservation de gamètes et tissus
germinaux ⁹ 14
Tableau 2 : Conservation autologue de tissus ovariens dans le cadre de la préservation de la fertilité ⁹
Tableau 3 : Liste des agents alkylants utilisés dans le traitement des cancers 24
Tableau 4 : Traitement oncologique à fort risque d'altération de la fonction ovarienne ²³ 24
Tableau 5 : Les cryoprotecteurs pénétrants et non-pénétrants les plus utilisés 30
Tableau 6 : Congélation lente vs vitrification, avantages et limites
Tableau 7 : Exemples de solutions de congélation utilisées pour la congélation lente de cortex ovarien
à travers le monde
Tableau 8 : Exemples de différents protocoles de vitrification utilisés à travers le monde
Tableau 9 : Liste des principaux polymères utilisés pour la formation d'hydrogels 41
Tableau 10 : Différentes méthodes de réticulations des polymères 43
Tableau 11 : Etudes relatant de la congélation à l'aide d'hydrogels 46
Tableau 12: Dextran-based hydrogel characterizations60
Tableau 13: Osmolality (mOsm) of Voluven [®] solution containing PSH_{40} , PSH_{70} , PSH_{500} and increasing
DMSO concentration
Tableau 14: Crystallization Temperature, (Tc in °C) of Voluven® solution containing PSH ₄₀ , PSH ₇₀ ,
PSH ₅₀₀ and increasing DMSO concentration
Tableau 15 : Solutions de congélation testées 82
Tableau 16 : Rendement de synthèse du PSH ₅₀₀ 88
Tableau 17 : Nombre et proportion de follicules intacts par type de follicule et par groupe

PREAMBULE

Ce travail de thèse est le résultat d'une rencontre avec un sujet qui questionne depuis de nombreuses années notre société tant sur le plan des connaissances médicales que celui des évolutions de notre société, de ses perceptions ou encore des questionnements éthiques qui conduisent à de nombreux débats : la préservation de la fertilité féminine.

En tant que clinicien travaillant dans un laboratoire hospitalier de Biologie de la Reproduction, c'est une problématique à laquelle je suis confronté chaque jour. L'amélioration des résultats des techniques actuelles est importante ; certes pour améliorer la prise en charge médicale des patientes, mais satisfaire le souhait des patients d'avoir une vie répondant à leurs attentes de parentalité est aussi une motivation profonde pour le clinicien que je suis. Cette demande est de plus en plus fréquente, y compris à l'adolescence, du fait de l'augmentation des pathologies cancéreuses et des perspectives de traitement de la maladie. L'amélioration de l'espérance de vie par des traitements lourds suscite des espoirs légitimes de procréation chez ces jeunes filles devenues adultes mais, grèvent voire interdisent les perspectives de maternité naturelle.

C'est cette problématique de préservation de la fertilité féminine par congélation des cellules germinatives que nous connaissons en clinique qui a conduit l'interaction entre le laboratoire de Biologie de la Reproduction de l'hôpital Bichat et le laboratoire académique Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS, Inserm U1148) souhaitant développer une technique de congélation innovante.

Le Laboratoire de Biologie de La Reproduction de l'hôpital Bichat est spécialisé dans les techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP). Il réalise quotidiennement des actes de fécondation in vitro classique (FIV) ou par injection intra cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). Il possède aussi une grande maitrise de la congélation lente de spermatozoïdes éjaculés ou testiculaires ainsi que de la vitrification d'embryons et d'ovocytes.

Le laboratoire LVTS (Inserm U1143) s'intéresse depuis plusieurs années aux propriétés biologiques de polysaccharides synthétiques ou naturels et à leurs rôles sous forme d'hydrogel dans des applications d'ingénierie tissulaire^{1,2}. Ces hydrogels se caractérisent par leur gonflement dans le milieu environnant. Leur structure pouvant être facilement modifiée, leurs propriétés peuvent être ajustées, ils peuvent être utilisés comme pansement pour les plaies ou les brûlures, mais également comme implants en chirurgie plastique ou, en recherche, comme plateformes de délivrance locale de substance ou encore comme supports de colonisation cellulaire. Ces hydrogels ont de plus démontré

au laboratoire leur efficacité dans la prévention des dommages liés au froid pour des cellules endothéliales et des tissus aortiques³.

C'est dans le cadre de cette rencontre à l'interface de disciplines différentes, la chimie, la biologie et la médecine, que se place mon travail de thèse.

Dans ce travail, notre objectif était donc d'adapter un hydrogel à base de dextrane mis au point pour des procédés de congélation à la cryopreservation de cortex ovarien, qui est l'une des techniques de préservation de la fertilité, en améliorant les résultats de la post-congélation et en diminuant de façon conséquente les concentrations en cryoprotecteurs et ainsi, leurs effets secondaires potentiels.

Dans ce manuscrit, nous aborderons tout d'abord la problématique de la préservation de la fertilité féminine, ferons un rappel anatomique et physiologique des cellules germinales, aborderons la question de la cryopréservation et plus particulièrement celle de la congélation de cortex ovarien selon les différentes techniques existantes à ce jour en passant en revue les résultats et les différents écueils dont elles peuvent être le sujet. Enfin, nous présenterons les hydrogels et leurs applications en congélation.

La partie expérimentale proprement dite sera divisée en trois chapitres. Dans le premier nous aborderons le processus de fabrication de l'hydrogel, ses propriétés physico-chimiques, sa biocompatibilité, ainsi que ses capacités cryoprotectrices en utilisant comme modèle une lignée de fibroblastes de souris (BALBc/3T3). Puis, nous traiterons de la mise au point de la congélation de cortex ovarien en utilisant le modèle murin qui est un des modèles le plus utilisé pour la mise au point de nouvelles procédures de congélation de cortex ovarien. Il a de surcroit l'avantage de pouvoir être mis en place simplement dans le laboratoire LVTS. Pour cela nous avons introduit ce modèle animal au laboratoire et avons défini la formulation optimale de notre hydrogel ainsi que celle du milieu de congélation associé. Enfin, nous exposerons nos premiers résultats sur la validation de ce dispositif en utilisant un modèle d'autogreffe d'ovaires de souris après congélation/décongélation que nous avons appris et transféré au laboratoire.

Revue de la littérature

I. PRESERVATION DE LA FERTILITE FEMININE

A. Cadre légal et recommandations

La préservation de la fertilité (PF) en France est inscrite dans le cadre de la loi de bioéthique depuis 2004 mise à jour le 7 juillet 2011 (Loi n°2011-814 – article 32)⁴. Elle 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. »

Il est de plus recommandé depuis 2010 par l'Institut National du cancer (INCa) et par le Collège National des Gynécologue et Obstétriciens Français (CNGOF) que toute femme âgée de moins de 40 ans et qui doit recevoir un traitement potentiellement gonadotoxique doit être informée des risques de ces traitements sur sa fertilité et des possibilités qu'il existe pour la préserver. Ces dispositions sont aussi inscrites dans le plan cancer de 2014-2019 qui prévoit l'information des patients dès la consultation d'annonce du traitement anti-cancéreux qui sera mis en place notamment chez les enfants et les adolescents. La patiente si elle souhaite préserver sa fertilité doit être adressée à un médecin spécialiste de la reproduction et compétant dans le domaine de la PF. En France cette activité est soumise à une autorisation particulière de L'Agence Régionale de Santé (ARS) des établissements de santé, et on compte actuellement 49 centres exclusivement publics autorisés à pratiquer une activité de PF.

B. Principales techniques

La PF féminine s'articule autour de quatre techniques de cryoconservation.

Tout d'abord la vitrification d'ovocytes matures (en Métaphase II de méiose)⁵, qui a été autorisée assez récemment en France, et dont la maitrise technique est arrivée à maturité dans le monde durant ces dix dernières années. Cependant cette technique ne peut être proposée qu'aux femmes en âge de procréer et s'accompagne d'une hyperstimulation ovarienne contrôlée nécessitant des doses importantes de gonadotrophines. Elle ne peut donc pas être proposée à toutes les femmes et nécessite un délai de 2 à 3 semaines avant la mise en place du traitement oncologique.

Il est aussi possible de réaliser une *vitrification d'ovocytes maturés in vitro* chez les patientes pubères en cas de contre-indication à des doses fortes d'hormones ou lorsque le délai avant mise en

12

place du traitement oncologique est trop court⁶. Pour cela une ponction d'ovocytes sans ou précédée d'une faible stimulation ovarienne est réalisée. Les ovocytes immatures ponctionnés sont alors maturés *in vitro* avant d'être vitrifiés.

La congélation d'embryons dans le cadre de la PF féminine peut aussi être proposée. Comme la vitrification d'ovocytes matures elle nécessite une hyperstimulation hormonale contrôlée avec des doses importantes de gonadotrophines et un délai avant mise en place du traitement anti cancéreux de 2 à 3 semaines. Cette technique est de moins en moins utilisée seule car elle implique non pas la patiente seule mais son couple⁷. En cas de séparation de celui-ci les embryons ne sont pas utilisables⁸.

Enfin, la *congélation de cortex ovarien* est la seule technique existante pour les jeunes filles prépubères dans le cadre de la PF avant un traitement potentiellement stérilisant. Elle est aussi proposée aux femmes pubères lorsque que les autres techniques ne sont pas réalisables. Le prélèvement s'effectue lors d'une intervention chirurgicale sous cœlioscopie dans la plupart des cas. Elle peut être couplée à la *vitrification d'ovocytes maturés in vitro* qui sont prélevés *ex vivo* sur la pièce de tissus ovarien.

C. Activité en France

L'activité de PF en France fait l'objet d'un rapport annuel de l'Agence de La Biomédecine (ABM). La part de l'activité représentée par la PF féminine est faible par rapport à l'activité globale (masculine et féminine) de la discipline⁹. En effet, dans le dernier rapport publié en septembre 2020 sur l'activité de 2018 sur les 8057 actes de conservations réalisés en 2018 seulement 25,8% (n=2075/8057) sont attribués à la PF féminine (Tableau 1).

Technique	Effectifs		
Conservation de spermatozoïdes			
Nombre de centres concernés	49		
Nouvelles conservations (patients)	5636		
Conservation de tissus testiculaires			
Nombre de centres concernés	16		
Nouvelles conservations (patients)	138		
Conservation d'ovocytes			
Nombre de centres concernés	46		
Nouvelles conservations (patientes)	1937		
Conservation de tissus ovariens			
Nombre de centres concernés	31		
Nouvelles conservations (patientes)	346		

Tableau 1 : Préservation de la fertilité en France en 2018, conservation de gamètes et tissus germinaux⁹

Concernant les actes de PF féminine, le rapport fait état de 1937 conservations d'ovocytes réalisées dans 46 centres, avec une augmentation de 16% par rapport à l'activité rapportée en 2017. Cette activité est pratiquée majoritairement chez les femmes de plus de 18 ans (n=1847/1937, 95,3%). Concernant la congélation de cortex ovarien 346 actes ont été réalisés en 2018, cette activité est stable par rapport à l'année précédente et évolue modérément (+ 7%) depuis 4 années (Tableau 2). Depuis 2015, 99 greffes de tissus ovariens (pour 95 patientes) ont été réalisées en vue de l'obtention d'une grossesse et seulement 5 naissances vivantes ont été rapportées, soit un taux de naissances vivantes de 5,05% par greffe de cortex ovarien (Tableau 2).

	2015	2016	2017	2018
Nouvelles autoconservations réalisées dans l'année (patientes)	323	301	346	346
Décongélation en vue de greffe				
Patientes	27	20	21	27
Greffes réalisées	31	20	21	27
Tentatives d'AMP	9	28	15	16
Enfants nés vivant issus d'une AMP	1	0	1	0
Enfants nés vivants hors AMP	-	-	-	3
Autoconservation au 31/12 (patientes)	2638	2845	3244	3490

Tableau 2 : Conservation autologue de tissus ovariens dans le cadre de la preservation de la fertilite	Tableau 2 : Conservation auto	logue de tissus ovarien:	s dans le cadre de la p	réservation de la fertilité ⁹
--	-------------------------------	--------------------------	-------------------------	--

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

Les différentes indications et les différentes techniques mises en jeu pour la conservation de tissus ovarien et son utilisation après décongélation seront décrites dans la suite de ce manuscrit aux paragraphes II.B et III.

II. OVAIRES, CORTEX OVARIEN

A. L'ovaire et ses composants

1. L'organogenèse et l'anatomie de l'ovaire

L'ovaire est un organe pair intra-péritonéal (Figure 1) de forme ovoïde dont la taille définitive d'environ 3 x 2 x 1 cm est atteinte vers l'âge de douze ans¹⁰.



Figure 1 : Anatomie de l'appareil génitale féminin d'après (A) une image coelioscopique et (B) un schéma. 1 = utérus, 2 = ovaire, 3 = trompe, 4 = ligament utéro-ovarien, 5 = ligament large

Les cellules germinales primordiales (CGP) apparaissent dans l'épiblaste dès la gastrulation et migrent de la vésicule vitelline le long du mésentère dorsal vers la crête génitale située à la face ventrale des mésonéphros pour former la gonade indifférenciée en fin de la 6^{ème} semaine de développement (SD) (Figure 2). Les CGP deviennent alors des *gonocytes*. A ce stade les gonades ont le même aspect morphologique et histologique dans les deux sexes.



Figure 2 : Migration des cellules germinales primordiales (CGP).

(1) intestin postérieur, (1) canal vitellin, (3) allantoïde, (4 rose) mésonéphros, (4 vert) crête génitale, (6 points rouges) CGP, (7) ébauche cardiaque. (source : embryologie.ch)

La différenciation en gonades féminines à lieu à partir de la 8^{ème} SD, les gonocytes se différencient alors en ovogonies. Elle se fait par défaut en absence de chromosome Y et du gène SRY permettant la différenciation en testicule qui, par ailleurs, se déroule plus précocement à partir de la $7^{ème}$ SD. Des signaux ovariens tels que ceux produit par le gène WNT4 semblent aussi avoir un impact dans la non différenciation testiculaire et la régression des cordons sexuels profonds ¹¹.

2. L'ovogenèse

Les gonocytes entrent en mitose dès qu'ils sont en contact avec l'épithélium cœlomique à partir de la 6^{ème} SD avant leur différenciation en ovogonies. Entre les 9^{ème} et la 22^{ème} SD a lieu une phase de multiplication active des ovogonies qui vont s'entourer d'amas de cellules isolées qui deviendront les cellules folliculaires. A la fin de cette phase de réplication intense on estime à 7 millions le nombre d'ovogonies. Une fois ce « pool » folliculaire formé celui-ci n'est pas renouvelable et ne fera que régresser à partir de ce moment. Il est important de noter que les *ovogonies* gardent entre elles des ponts cytoplasmiques qui leur permettront de synchroniser leur développement.



Figure 3 : Ovogenèse. GP = globule polaire

Parallèlement à cette phase de multiplication les *ovogonies* entrent en prophase de méiose I à partir de la 12^{ème} SD puis s'arrêtent au stade diplotène pour rentrer en diplotène (Figure 3). A ce stade on parle alors d'ovocyte I ou ovocyte de premier ordre. La reprise de la méiose et la phase dite réductrice n'interviendront qu'au moment de l'ovulation avec l'émission du 1^{er} globule polaire, puis du second lors de la fécondation par le spermatozoïde (Figure 3). Les ovocytes I sont donc en diplotène de la vie intra-utérine à la puberté.

A partir de la 16^{ème} SD se produit le phénomène d'atrésie folliculaire. On estime qu'à la naissance il subsiste environ 700 000 follicules primordiaux et seulement 300 000 à la puberté.

3. La folliculogenèse

Nous avons donc vu que le « pool » de follicules primordiaux est constitué dès la naissance. A partir de l'adolescence et jusqu'à la ménopause les follicules primordiaux vont se développer par vagues successives rythmées par les cycles menstruels. Une très faible quantité de follicules va atteindre l'ovulation (environ 300, soit moins de 0,1%) et une grande majorité va involuer (99,9%).

a. Le follicule primordial et follicule primaire

Le follicule primordial mesure environ 40µm de diamètre. Il est constitué d'un ovocyte I (diamètre entre 20 et 30µm) entouré d'une seule couche de cellules folliculeuses aplaties (Figure 4A). Leur ensemble constitue ce que l'on appelle couramment la réserve ovarienne qui s'est constituée, comme nous l'avons vu précédemment, pendant la vie intra-utérine.



Figure 4. Follicule primordial (A) et primaire (B). Oovcyte I (1). Couche de cellules folliculeuses aplaties (B,1) et cubiques (B,2) (source : *embryologie.ch*) La taille du follicule primaire est d'environ 45 à 50µm. Il est toujours constitué d'un ovocyte I

entouré d'une seule couche de cellules folliculeuses qui deviennent cubiques (Figure 4B).

b. Le follicule secondaire



Figure 5 : Follicule secondaire.

Ovocyte I (1), zone pellucide (2), cellules de la granulosa (3), cellule de la thèque (4) (source : *embryologie.ch*)

Les cellules folliculeuses se multiplient de façon importante pour former un épithélium pluristratifié entouré d'une membrane basale externe. Ce contingent de cellules prend le nom de cellules de la granulosa. De plus, il apparait autour de l'ovocyte I une matrice extracellulaire de glycoprotéines sulfatés appelée zone pellucide (Figure 5). Elle jouera un rôle majeur dans la fécondation en tant que bloc inter-espèces et comme barrière à la polyspermie. Elle permet aussi le maintien de cellules lors des phases précoces du développement embryonnaire. A l'extérieur de la membrane basale les cellules du stroma ovarien se différencient en cellules de la thèque folliculaire qui auront une fonction endocrine importante avec la sécrétion d'œstrogènes. A ce stade le follicule atteint la taille d'environ 200µm.

c. Le follicule tertiaire ou antral

Il apparait à ce stade dans les cellules de la granulosa des lacunes liquidiennes qui vont confluer pour former la cavité folliculaire ou antrum. Les cellules de la granulosa les plus proches de la zone pellucide qui font saillie dans l'antrum prennent le nom de cellules du *cumulus oophorus* et celles en contact de la zone pellucide prennent le nom de *corona radiata*.

L'ovocyte mesure alors environ 90µm et le follicule passe de 200µm à environ 12mm de diamètre. Les cellules de la thèque se différencient en thèque interne vascularisée qui acquiert sa fonction endocrine et en thèque externe qui joue le rôle de tissu conjonctif de soutien (Figure 6).



Figure 6 : Follicule tertiaire.

Ovocyte I (1), zone pellucide (2), cellules de la granulosa (3), cellules de la thèque interne (4), thèque externe (5), antrum (6), cumulus oophorus (7), membrane basale (8). (source : *embryologie.ch*)

d. Le follicule de De Graff ou pré-ovulatoire

A ce stade les cellules folliculeuses continuent à se multiplier pour atteindre un nombre d'environ 50 millions et l'antrum grossit de façon importante pour atteindre un volume de 2 à 5mL. L'ovocyte I atteint alors son diamètre final de 120µm. Juste avant l'ovulation la taille du follicule est d'environ 23mm. Lors de l'ovulation ce follicule de De Graff se rompt et expulse l'ovocyte I entouré du *cumulus oophorus* qui reprend alors sa méiose. Celle-ci va de nouveau s'arrêter en métaphase II après l'expulsion du premier globule polaire par l'ovocyte. Les différentes étapes menant à l'ovulation sont représentées Figure 7.



Figure 7 : Représentation schématique de la folliculogenèse ovarienne.

(1) vascularisation de la thèque externe (2), (3) thèque interne, (4) antrum, (5) membrane basale, (6) granulosa,
 (7) cumulus oophorus, (8) zone pellucide, (7) ovocyte I (source : *EMC*¹⁰)

Le follicule de De Graff qui a expulsé l'ovocyte devient alors un corps jaune ou *corpus luteum* dont le rôle est dans un premier temps de sécréter de la progestérone qui va préparer l'endomètre utérin à accueillir l'embryon favorisant ainsi son implantation. Si l'embryon s'implante le corps jaune sera maintenu jusqu'au 4^{ème} mois de grossesse, dans le cas contraire il régresse.

4. Le tissu ovarien

L'ovaire de par sa double fonction, endocrine et de reproduction, est constitué de divers types cellulaires. On peut distinguer en son sein deux régions distinctes, les régions corticale et médullaire.



Figure 8 : Coupe histologique d'un ovaire humain entier. Coloration hématoxyline éosine

La région corticale ou cortex ovarien est la zone la plus périphérique de l'ovaire. C'est celle qui nous intéresse dans la suite de ce travail. Elle comporte à sa surface l'épithélium ovarien cubique simple qui repose sur un tissu conjonctif constitué principalement de substance fondamentale. En dessous on trouve le stroma cortical et chez la femme en activité génitale les différents types de follicules que nous avons décrits dans la partie précédente (3), un corps jaune éventuel et des corps blancs, cicatrices de corps jaunes. Le stroma comprend des cellules fibroblastiques, très peu de fibres et les cellules endothéliales des capillaires assurant sa vascularisation (Figure 8).

La région médullaire est la zone centrale de l'ovaire, elle est constituée de tissu conjonctif lâche. Elle est le siège du hile ovarien vascularisé par l'artère ovarienne qui rejoint l'ovaire par le ligament large (Figure 8).

B. Le cortex ovarien dans la préservation de la fertilité

1. Contexte épidémiologique

Il existe en France depuis les années 80, comme dans tous les autres pays industrialisés, une augmentation de l'incidence des cancers chez les jeunes enfants d'environ 0,6% par an. Celle-ci est accompagnée heureusement d'une amélioration de la prise en charge de ces patients et des traitements qui ont augmenté de façon très importante leur espérance de vie. Celle-ci est actuellement estimée à environ 80% à 5 ans¹².

Cette forte amélioration de la survie à long terme chez ces jeunes patients, depuis les 30 dernières années, a permis d'observer l'apparition d'effets secondaires à long terme chez ces derniers, notamment des problèmes d'hypo-fertilité, voire de stérilité totale secondaire aux traitements par radiothérapie, chimiothérapie et/ou chirurgicaux¹³. Il a été estimé en 2008 qu'il y avait en France environ 3 millions de personnes de plus de 15 ans guéries d'un cancer, avec une répartition homme/femme de l'ordre de 50%¹⁴.

2. Les indications de la congélation de cortex ovarien

Aussi, pour les enfants ou filles prépubères la seule solution qui peut être proposée est la congélation de cortex ovarien qui renferme les follicules primordiaux constituant la réserve des cellules germinales de ces jeunes filles^{15,16}. De même cette technique est parfois la seule alternative possible chez la femme en âge de procréer lorsqu'une stimulation ovarienne est contre indiquée ou qu'elle ne peut être réalisée avant la mise en place d'un traitement anticancéreux en urgence¹⁶.

Selon les dernières recommandations émises par l'European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) en aout 2020 la préservation de la fertilité par congélation de cortex ovarien doit être proposée aux patientes qui ne peuvent pas bénéficier d'une vitrification d'ovocyte ou d'embryons¹⁷. Ces recommandations suggèrent que l'efficacité de cette procédure est questionnable chez les femmes de plus de 36 ans¹⁸ ou présentant une réserve ovarienne basse (hormone anti-mulherienne (AMH) < 0,5 ng/mL et compte des follicules antraux < 5)¹⁹.

La décision de la réalisation d'une congélation de tissu ovarien doit être multidisciplinaire. L'évaluation de balance bénéfice/risque est très importante car le prélèvement de tissu ovarien ne doit pas être plus délétère que le traitement anti-cancéreux en lui-même. L'impact de ces traitements sur la fertilité varie en fonction de plusieurs éléments : comme le type de traitement (radiothérapie, chimiothérapie...), le type de molécule (agents alkylants notamment), la dose utilisée,

23

la chirurgie effectuée (orchidectomie, ovariectomie), l'âge de la patiente^{20,21}. De plus il existe une variabilité interindividuelle dans la réponse aux traitements et donc de leurs conséquences sur les gonades²². Les agents alkylants restent les plus toxiques (Tableau 3) mais les traitements les plus stérilisants associent la radiothérapie pelvienne à la chimiothérapie²³.

Famille	Molécule (nom commercial)
Moutardes à l'azote	Melphalan* (Alkéran®)
	Chlorambucil* (Chloraminophène®)
	Cyclophosphamide (Endoxan [®])
	Ifosfamide (Holoxan [®])
	Estramustine (Estracyt [®])
	Melphalan* (Alkéran®)
	Chlorambucil (Chloraminophène®)
	Cyclophosphamide* (Endoxan [®])
	Ifosfamide* (Holoxan [®])
	Estramustine (Estracyt [®])
Nitroso-urées	Carmustine (Bicnu [®])
	Fotemustine (Muphoran [®])
	Lomustine (Belustine [®])
	Streptozotocine (Zanosar [®])
Dérivés du platine	Cisplatine (Cisplatyl [®])
	Carboplatine (Paraplatine [®])
	Oxaliplatine (Eloxatine [®])
Divers non classés	Mitomycine C (Amétycine®)
	Dacarbazine* (Déticène®)
	Busulfan* (Myléran®)
	Procarbazine* (Natulan [®])
	Thiotepa (Thiotepa®)
	Temozolomide (Temodal®)

Tableau 3 : Liste des agents alkylants utilisés dans le traitement des cancers

*Traitements à haut risque d'altération de la fonction ovrarienne^{7,16}

Seules quelques indications sont indiscutables comme l'administration de doses importantes d'agents alkylants, l'ovariectomie bilatérale ou encore la radiothérapie corps entier à forte dose²⁴ (Tableau 4).

Tableau 4 : Traitement oncologique à fort risque d'altération de la fonction ovarienne²³

Irradiation corporelle totale	
Radiothérapie abdominale totale	
Radiothérapie pelvienne	
Chimiothérapie avec agents alkylants	
Chimiothérapie forte dose avant greffe de moelle osseuse	
Ovariectomie bilatérale, ou unilatérale sur ovaire unique	

Dans le cas où une patiente a déjà reçu ou est en cours de chimiothérapie à faible dose de mise en place récente, il est envisageable de réaliser un prélèvement et une congélation de cortex

ovarien avec des chances de grossesse et de restauration de la fonction ovarienne semblable à des patientes ayant bénéficié de cette procédure avant la mise en place du traitement oncologique. En effet une étude récente a montré que sur 22 patientes greffées qui avaient été exposées à une chimiothérapie avant le prélèvement de cortex ovarien, 7 ont obtenu une naissance contre 0/9 dans la population non exposée à une chimiothérapie antérieure²⁵.

Outre le cadre oncologique, certaines équipes proposent la congélation de cortex ovarien dans d'autres indications comme la torsion ovarienne ou certaines maladies auto-immunes^{18,26}.

3. Le prélèvement de tissu ovarien

Le prélèvement de tissu ovarien se fait de façon privilégiée par cœlioscopie. Parfois la laparotomie est utilisée lorsque le prélèvement est associé à une chirurgie dans le cadre de la prise en charge oncologique.

Dans la majorité des cas un ovaire entier est prélevé que la patiente soit prépubère ou adulte. Celui-ci est ensuite acheminé par coursier à +4°C dans un liquide de transport vers un laboratoire de Biologie de la Reproduction ayant l'autorisation de réaliser les techniques de PF.

La médullaire est ensuite séparée du cortex ovarien, ce dernier est à son tour découpé en fragments de 0,5cm² à 1cm² pour 1mm d'épaisseur (Figure 9). Ceux-ci sont classiquement placés dans des cryotubes avec un milieu de congélation contenant un agent cryoprotecteur pénétrant, le diméthyl sulfoxyde (DMSO), associé au sérum de la patiente. Il est ensuite placé dans un congélateur programmable pour une descente en température contrôlée avant d'être placé pour conservation dans un container d'azote liquide à -196°C²⁷.



Figure 9 : Fragments de cortex ovarien après traitement au laboratoire de biologie de la reproduction (d'après Fortin *et al.* 2019)²⁸

Parallèlement à la congélation, un examen anatomopathologique est effectué sur un fragment de cortex. Il a pour but la recherche d'une éventuelle localisation métastatique du cancer et permet d'évaluer la quantité de follicules primordiaux présents sur un fragment.

4. La greffe du cortex ovarien

Après décongélation, les fragments de cortex ovarien peuvent être greffés de deux façons différentes : en position hétérotopique ou en position orthotopique.

La greffe hétérotopique consiste à réintroduire un ou plusieurs fragments de cortex ovarien décongelé(s) dans un emplacement à distance de sa situation initiale. Il peut, par exemple, être greffé en position sous cutanée afin de restaurer une fonction endocrine ou d'initier la puberté chez une patiente ayant été prélevée avant la puberté. En 2012 l'équipe du Professeur Poirot a publié la première greffe à succès réalisée dans cet objectif²⁹.

La greffe orthotopique consiste à replacer sous coelioscopie plusieurs fragments de cortex ovarien décongelés dans la loge ovarienne dans laquelle une fenêtre de réimplantation est préalablement réalisée afin de stimuler la formation de vaisseaux (Figure 10). La première greffe orthotopique de cortex ovarien semble avoir été réalisée en février 1999 et a permis une restauration de la fonction ovarienne endocrine durant 9 mois mais sans grossesse³⁰. Ce n'est qu'en

2004 que l'équipe de Jacques Donnez obtient la première naissance vivante après une greffe orthotopique de cortex ovarien à la suite d'une grossesse naturelle¹⁶. Depuis, plusieurs séries de grossesses naturelles ou à la suite d'une procédure d'AMP ont été publiées. On estime aujourd'hui qu'environ 150 naissances ont été obtenues grâce à la congélation/décongélation puis greffe de fragments de cortex ovarien^{31–34}.





Il est important de noter que cette technique est soumise à un écueil important. En effet, pour certains types de cancers un risque majeur de réintroduction de la maladie existe. On peut citer en exemple les leucémies³⁶, le lymphome de Burkitt et le neuroblastome⁷. Ce risque doit être abordé avec la patiente avant la réalisation de la PF et bien évidement pris en compte lors de la réimplantation d'un ou plusieurs fragments. Cependant des outils de détection de la maladie résiduelle ont été développés comme une technique de réaction polymérisation en chaine en temps réel (RT-PCR) permettant la détection de transcrits codant pour des antigènes spécifiques des cellules leucémiques³⁷, des lymphomes et aussi de certains cancers solides comme le neuroblastome³⁸.

III. LA CRYOPRESERVATION DU CORTEX OVARIEN

Nous avons aussi vu que le tissu ovarien était un tissu complexe de par ses fonctions multiples (folliculogenèse, ovulation, fonction endocrine...) et les nombreux types cellulaires dont il est composé (cellules folliculaires, ovocytes, cellules endothéliales etc.). Cette pluralité cellulaire et fonctionnelle rend ce tissu difficile à congeler.

Il existe à l'heure actuelle deux méthodes de congélation de cortex ovarien. La méthode la plus répandue et qui reste celle de référence, est la technique de congélation lente. Une autre technique plus récente est la vitrification. Elle a connu un essor important au début des années 2010 notamment dans le domaine de l'AMP avec le développement de la vitrification embryonnaire puis de la vitrification d'ovocyte dont les taux de survie d'environ 98% ont représenté une révolution^{5,39–41}. C'est cet engouement pour la vitrification ovocytaire et embryonnaire qui conduit à adapter cette technique pour la congélation de cortex ovarien. Ces deux techniques nécessitent l'utilisation d'agents « antigels » nommés cryoprotecteurs.

A. Les agents cryoprotecteurs

Les cryoprotecteurs regroupent « l'ensemble des éléments additifs qui ajoutés à une solution de congélation permettent une survie post congélation/décongélation supérieure à celle obtenue en leur absence »⁴². Ils sont de deux types : les cryoprotecteurs pénétrants et les cryoprotecteurs nonpénétrants.

1. Les cryoprotecteurs pénétrants

Les cryoprotecteurs pénétrants jouent le rôle le plus important durant la congélation. Ce sont des molécules de petites tailles (<400Da) très solubles dans l'eau et qui doivent être capables de traverser la membrane cytoplasmique des cellules⁴². Ils assurent une protection mécanique en abaissant la température de solidification de l'eau et en remplaçant l'eau intracellulaire empêchant alors la formation de cristaux intracellulaires létaux lors de la congéation⁴³. Ils procurent aussi une protection biochimique en abaissant la concentration des autres substances en solution, ce qui évite l'hyper concentration saline qui se produit lors de la formation de cristaux de glace. En effet, quand une solution aqueuse gèle, la glace résultante est essentiellement constituée d'eau pure cristallisée⁴⁴. Enfin, leur présence limite l'amplitude du gradient de pression osmotique croissant qui apparait lors de la descente en température qui peut induire une rupture des parois cellulaires⁴⁵.

Le premier cryoprotecteur pénétrant décrit dans la littérature est le glycérol utilisé en 1949 pour vitrifier des spermatozoïdes⁴⁶. Il existe plusieurs cryoprotecteurs pénétrants dont les plus couramment utilisés en biologie de la reproduction sont le diméthyl sulfoxyde (DMSO), l'ethylène-glycol (EG) et le propylène-glycol (ou 1,2-propanediol (PrOH)) (Tableau 5). Ils sont utilisés à des concentrations très variables allant de 5% (v/v) pour la congélation lente à plus de 40% (v/v) en vitrification.

De plus leur utilisation est loin d'être anodine. Il est démontré qu'ils peuvent être cytotoxiques lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations importantes (> 7,5%) ou lorsque le temps de contact entre les cellules et le cryprotecteur pénétrant est supérieur à 1 heure. En effet, le PrOH peut induire des dommages sur l'ADN sur des ovocytes de souris lorsqu'il est utilisé à de fortes concentrations (de 7,5 à 15%)⁴⁷. L'EG et le PrOH sont susceptibles d'entrainer des cassures des brins d'ADN de façon dose-dépendante⁴⁸.

Le DMSO semble lui, ne pas être responsable de cassures des brins d'ADN mais possède tout de même une certaine cytotoxicité. En effet, testé sur une lignée de cellules ovariennes de hamster, il induit une diminution de 50% des cellules viables à une concentration faible de 13,2mg/ml (environ 0,17M) après 24 heures d'incubation⁴⁸. Il a été aussi montré que le glycérol à des concentrations de 20% provoque des dommages au niveau de la membrane plasmique et de l'ultrastructure des spermatozoïdes, tout comme le DMSO à des concentrations équivalentes⁴⁹. Enfin des effets secondaires parfois sévères pouvant aller jusqu'à l'arrêt cardio-respiratoire ont été observés chez certains patients lors de transplantation de cellules souches hématopoïétiques congelées avec du DMSO^{50,51}.

2. Les cryoprotecteurs non-pénétrants

Les cryoprotecteurs non-pénétrants sont incapables de pénétrer la membrane cytoplasmique sauf rares exceptions⁵². Ce sont en majeure partie des sucres ou des polymères (Tableau 5). Leur utilisation permet de réduire les concentrations en cryoprotecteurs pénétrants potentiellement cytotoxiques. Leur rôle est d'augmenter la pression osmotique extracellulaire permettant ainsi de réguler la déshydratation des cellules pendant le refroidissement et d'éviter une réhydratation trop rapide pendant le réchauffement⁴³. De plus en augmentant la viscosité de la solution et en limitant la formation des cristaux extracellulaires, ils jouent un rôle dans la protection des membranes⁴⁵.
Cryoprotecteurs pénétrants	Cryoprotecteurs non-pénétrant			
	Sucres	Polymères		
Dimethyl sulfoxide (DMSO)*	Sucrose*	Polyéthylène glycol		
Ethylène-glycol*	Thréhalose*	Polyvinyl pyrolidone		
Propylène-glycol* (ou 1,2-propanediol)	Raffinose	Hydroxy ethyl starch		
Glycérol	Mannitol	Ficoll		
Méthanol	Glucose	Protéines du sérum		
Ethanol	Galactose	Protéines de lait		

Tableau 5 : Les cryoprotecteurs pénétrants et non-pénétrants les plus utilisés

*à usage très rependu, d'après Gurruchaga *et al.*⁴³

B. Les procédures de congélation

1. La congélation lente

La congélation lente est une technique ancienne dont on trouve des publications datant d'il y a plus de 50 ans⁵³ et qui a pu évoluer durant ce demi-siècle. Son principe de base réside dans le fait d'éviter la formation de cristaux de glace intracellulaires qui sont délétères⁵⁴. Pour atteindre cet objectif il faut déshydrater la cellule de façon progressive et optimale⁴³. Les cryoprotecteurs jouent ici un rôle important, ils augmentent l'osmolarité extracellulaire facilitant la sortie d'eau des cellules, puis ils entrent dans celles-ci afin d'éviter la formation de cristaux intracellulaires. Le phénomène de cristallisation et de déshydratation est aussi contrôlé par une descente en température lente et contrôlée. Selon Manzur *et al.* la descente en température doit permettre une déshydratation réversible n'entrainant pas de dommages cellulaires. Si la descente en température est trop lente la déshydratation peut être trop importante et donc potentiellement délétère. Cependant si la descente en température est trop rapide la cellule ne peut se déshydrater correctement ce qui entraine la persistance d'eau intracellulaire et la formation de cristaux de glaces intracellulaires létaux. Il a été montré que la descente en température optimale pour des cellules nucléées était de -1°C par minute⁵⁵ (Figure 11).



Figure 11 : Représentation schématique des hypothèses de Mazur et al.

Vers la gauche la descente en température est trop lente et la déshydratation entraine des dommages cellulaires irréversibles. Vers la droite la descente en température est trop rapide, la cellule n'est pas suffisamment déshydratée et il apparait des cristaux intracellulaires létaux. Au centre la descente en température est optimale (de l'ordre de 1°C/min) la déshydratation est suffisante pour éviter la formation de cristaux intracellulaires et assez modérée pour ne pas entrainer des dommages cellulaires irréversibles. (tiré de Gurruchaga et al.)⁴³

Un autre point critique lors de la congélation lente est la nucléation de la glace qui consiste en l'amorçage du processus de formation d'un cristal de glace. Elle se produit vers -7°C. Celle-ci est le plus souvent induite par un « seeding » afin d'améliorer la survie cellulaire⁵⁶. En effet, ce seeding a pour but de favoriser une nucléation homogène du milieu afin de limiter la formation de cristaux de glace hétérogènes dont la structure peut être délétère pour l'échantillon congelé⁵⁷. Celui-ci est classiquement effectué par choc thermique en mettant en contact brièvement les échantillons avec de l'azote liquide ou les mettant en contact avec un élément très froid comme une tige en fer placée préalablement dans l'azote liquide⁵⁷.

Lors de l'étape de décongélation de l'échantillon il peut se produire un phénomène de recristallisation avec formation de nouveaux cristaux de glace potentiellement délétères. Afin de diminuer ce phénomène de recristallisation la montée en température doit être rapide, pour cela les échantillons sont plongés habituellement dans un bain marie à 37°C⁵⁸.

La congélation lente à plusieurs avantages : (i) c'est une technique simple à maitriser car la descente en température est automatisée, (ii) elle utilise des concentrations relativement faibles de cryoprotecteurs pénétrants, (iii) elle permet la congélation de volumes relativement importants (plusieurs mL). Cependant elle autorise la formation de cristaux de glace extracellulaires qui peuvent tout de même léser les cellules. Les avantages et inconvénients de la technique de congélation lente sont exposés au Tableau 6.

2. La vitrification

La vitrification peut être définie par « *la solidification d'un liquide non pas par cristallisation mais par une élévation extrême de la viscosité pendant la phase de refroidissement* »⁵⁹. Durant la vitrification la solution qui était liquide devient vitreuse (un état proche du verre, Figure 12), les mouvements moléculaires sont ainsi stoppés ce qui marque l'arrêt du temps biologique pour une cellule⁶⁰. Cet état est atteignable uniquement en combinant : (i) une viscosité très élevée et (ii) une descente en température ultra rapide estimée entre -2500°C/min à -50000°C/min⁶¹.



Figure 12 : Aspect macroscopique d'une vitrification.

(A) Etat vitreux sans formation de cristal de glace, (B) vitrification partielle avec formation de cristaux de glace. (d'apres Fahy et al.)⁵⁹

Cette technique nécessite donc d'exposer l'élément à vitrifier à de très fortes concentrations en cryoportecteurs pénétrants (de 30 à 40%) qui sont potentiellement délétères pour les cellules, afin d'obtenir la viscosité nécessaire. De plus une descente en température aussi importante n'est atteignable qu'avec un faible volume (quelques µL maximum) plongé directement dans l'azote liquide. Les avantages et limites de la technique de vitrification sont exposés ci-dessous (Tableau 6).

Pour la procédure de dévitrification l'échantillon doit réaliser la transition inverse de celle réalisée lors de l'étape de vitrification. Il doit donc passer de l'état vitreux à liquide sans passer par la phase dite solide avec la formation de cristaux de glace. Afin de réaliser cette étape, la montée en

Revue de la littérature

température doit être aussi rapide que celle de la descente (plusieurs milliers de degrés par minutes). Pour cela l'échantillon est déplacé le plus rapidement possible de l'azote liquide à -196°C au milieu de dévitrification à 37°C.

	Congélation lente	Vitrification
Avantages	Simple et semi-automatisée	Etat vitreux sans formation de glace
	Concentration limitée en cryoprotecteurs	Convient à tout type de cellule
	pénétrants	
	Adapté à tout type de volume (jusqu'à	
	plusieurs mL)	
Limites	Formation de cristaux de glaces extracellulaires	Méthode manuelle nécessitant un
	Ne convient pas aux cellules avec un	opérateur entrainé
	cytoplasme très riche en eau (e.g ovocyte)	Chronophage
		Concentration élevée en cryoprotecteurs
		pénétrants
		Adaptée aux volumes faibles
		uniquement (quelques μL)
		Réactifs et consommables couteux

Tableau 6 : Congélation lente vs vitrification, avantages et limites

Revue de la littérature

C. Congélation du cortex ovarien

1. Congélation lente de cortex ovarien

Le protocole de congélation lente de cortex ovarien a été optimisé par divers équipes durant de longues années. Il est maintenant quasiment le même à travers le monde. La solution de congélation la plus utilisée est la suivante : une base tamponnée, pour stabiliser son pH, complétée avec du DMSO ou du PrOH à 1.5M (10% v/v) associée ou non à 0.1M de sucrose. Le tout étant complété avec du sérum de la patiente décomplémenté ou un équivalent (albumine de sérum humain, ou sérum de veau fœtal). Quelques solutions de congélation utilisées à travers le monde sont présentées au niveau du Tableau 7.

Tableau 7 : Exemples de solutions de congélation utilisées pour la congélation lente de cortex ovarien àtravers le monde

Publication	Cryoprotecteurs utilisés	Pays
Donnez <i>et al.</i> ³⁵	1,5M DMSO	Belgique
Sanfilippo <i>et al.</i> ⁶²	1,5M PrOH + 0,025M Raffinose	France
Oktay <i>et al.</i> ³⁰	1,5M DMSO + 0,1M sucrose	Etats-Unis
Revelli <i>et al.</i> 63	1,5M PrOH + 0,1M sucrose	Italie
Gook et al. ⁶⁴	1,5M PrOH + 0,1M sucrose	Australie
Silber <i>et al.</i> ⁶⁵	1,5M PrOH + 0,1M sucrose	Etats-Unis

HSA : albumine de sérum humain, DMSO : dyméthyl sulfoxide, PrOH : propylène-glycol

Avant la descente en température contrôlée, les fragments de cortex ovariens sont placés individuellement dans un cryotube contenant la solution de congélation pendant 30 minutes à +4°C ou dans un bain de glace, puis dans l'appareil de descente en température contrôlée en suivant les étapes décrites dans la Figure 13.



Equilibration dans la solution de congélation 30min à +4°C

Figure 13 : Descente en température contrôlée employée pour la congélation de cortex ovarien humain (adapté de Rivas Leonel *et al.*²⁷)

Concernant l'étape de décongélation, le cryotube contenant le fragment de cortex ovarien est placé au bain marie à 37°C pendant 2 minutes. Puis le fragment est retiré du cryotube et rincé plusieurs fois dans du milieu de culture tamponné afin d'éliminer la totalité des cryoprotecteurs potentiellement toxiques avant l'étape de greffe.

2. Vitrification du cortex ovarien

La vitrification de cortex ovarien a été développée à la suite des résultats obtenus en vitrification d'ovocytes ou d'embryons. De nombreuses équipes se sont intéressées au sujet en expérimentant divers cryoprotecteurs pénétrants à des concentrations différentes, afin d'obtenir la viscosité nécessaire au processus de vitrification de ce tissu.

Cette technique nécessite une descente en température ultra rapide difficilement atteignable avec un cryotube classique en raison du volume de celui-ci et de l'épaisseur du plastique dont il est composé. Des matériaux spécifiques ont été développés permettant d'atteindre une telle descente en température. L'équipe de Kanagawa *et al.* a été l'une des pionnières dans ce domaine. Avant la procédure de vitrification, les fragments sont placés dans une solution d'équilibration contenant 7,5% EG + 7,5% DMSO + 20% de substitut de sérum synthétique à température ambiante pendant 25 minutes. Puis les fragments sont transférés dans la solution de vitrification contenant 20% EG + 20% DSMO + 20% de substitut de sérum synthétique pendant 15 minutes à température ambiante. Après avoir été imprégnés de cryoprotecteurs les fragments sont ensuite déposés sur une plaque métallique ajourée Cryotissue©. La plaque est ensuite plongée directement dans l'azote liquide à -196°C puis dans un container à azote liquide⁶⁶. Plusieurs supports utilisés pour la vitrification de cortex ovarien sont présentés dans la Figure 14



Figure 14 : Supports utilisées pour la vitirifcation de cortex ovarein. (A) Fragments de cortex ovarien placés sur des aiguilles d'acupuncture⁶⁷, (B) Fragment de cortex ovarien placé sur CryoSupport^{®68}, (C) fragment de cortex ovarien déposé sur une plaque Cryotissue⁶⁶. Les barres noires représentent 1cm.

Pour l'étape de réchauffement ou dévitrification, la plaque supportant les fragments est placée dans un premier milieu contenant 1M de sucrose et 20% de substitut de sérum synthétique à 37°C pendant 3 minutes puis dans une solution de 0.5M de sucrose à température ambiante pendant 5 minutes.

De nombreux travaux portant sur la mise au point de milieu de vitrification, des concentrations et des temps d'exposition aux cryoprotecteurs, ont été effectués. Le Tableau 8 présente une liste non exhaustive des différents protocoles de vitrification.

Contrairement à la congélation lente où les protocoles de congélation sont très semblables d'une équipe à l'autre, de nombreux protocoles avec très peu de similarité entre eux existent pour la technique de vitrification (Tableau 8). Les variations portent sur les cryoprotecteurs utilisés, leurs concentrations, les temps et température d'exposition, mais aussi le type de support. Cette absence de standardisation observée en vitrification et qui rend difficile les comparaisons et l'analyse des résultats, fait que la technique de congélation lente reste le « gold standard » dans la congélation de cortex ovarien⁶⁹.

Publication	pays	Solution d'équilibration (tps exp, T°C)	Solution de vitrification (tps exp, T°C)	Support de vitrification
Gandolfi <i>et al.</i> ⁷⁰	Italie	1 : 0,64M EG + 20% SVF (30min, glace)	1 : 5,64M EG + 5% polyvinylpyrrolidone +	Paillette fermée 0,5mL
		2 : pas d'équilibration	0,4M threhalose + 20% SVF (5min, NC)	
			2 : 3,58M EG + 2,82M DMSO + 20% SVF	
(7			(1min, NC)	
Wang et al."	Chine	1 : 10% EG + 10% DMSM + 20% SVF (5min,	1 : 20% EG + 20% DMSO + 20% SVF (5min,	1 : Pipette Pasteur
		NC)	NC)	2 : Aiguille d'acupuncture (contact direct
		2 : 7,5% EG + 7,5% DMSO + 20% SVF	2 : 15% EG + 15% DMSO + 0,5M sucrose +	avec l'azote liquide)
		(10min, T°A)	20% SVF (2min, T°A)	
Kagawa <i>et al.</i> 66	Etats-Unis	7.5% EG, 7.5% DMSO	20% EG, 20% DMSO	Plaque ajourée Cryotissue©
		+ 20% SSS (25min, NC)	+ 20% SSS (15min, NC)	
lsachenko <i>et al.</i> ⁷¹	Allemagne	12,5% (5min, T°A) puis 25% (5min, T°A)	2,62M DMSO, 2,6 M acetamide, 1,31 M	Fragment plongé directement dans
		puis 50% (15min, +4°C) de la solution de	propylene glycol, +0,0075 M polyethylene	l'azote liquide sans support
		vitrification	glycol (15min, +4°C)	
Oktem et al. ⁷²	Turquie	pas d'équilibration	15% PrOH + 15% EG + 0,2M sucrose + 0,2M	Cryotube 0,5mL
			sucrose + 10% HAS (10min,NC)	
Amorim <i>et al.</i> ⁷³	Belgique	1 : 2M DMSO + 0,1M sucrose + 12% SVF	1 : 2M DMSO + 2M PrOH + + 0,2M sucrose +	Paillette de 0,1mL
		(5min, T°A)	12% SVF (5min, T°A)	ou goutte de 0,1mL (contact direct avec
		2: 7,5% EG + 7,5% DMSO + 6% SVF (20min,	2 : 15% EG + 15% DMSO + 6% SVF (3min, T°A)	l'azote liquide)
		T°A)	3 : 38% EG + 0,5M trehalose + 6% SVF (1min,	ou plaque métallique placée dans l'azote
		3 : 10% de (38% EG + 0,5M trehalose + 6%	T°A)	liquide (contact direct avec l'azote
		SVF) (3min, T°A), puis 50% (1min, T°A)		liquide) puis cryotube déjà à -196°C
Fabbri <i>et al.</i> ⁷⁴	Italie	2M PrOH + 3M EG + 0,2M sucrose + 15%	3M PrOH + 5M EG + 0,5M sucrose + 15% HSA	Système ouvert 0,2mL (contact direct
		HSA (30min, 4°C)	(30min, 4°C)	avec l'azote liquide)
Sanfilippo <i>et al.</i> ⁶²	France	0,37M PrOH, 0,37M EG (5min, T°A)	1,5M PrOH, 1,5M EG + 0,5M raffinose	Goutte de 0,02mL (contact direct avec
		puis 0,75M PrOH, 0,775M EG (5min, T°A)	(10min, +4°C)	l'azote liquide)

Tableau 8 : Exemples de différents protocoles de vitrification utilisés à travers le monde

Tps exp : temps d'exposition, EG : éthylène glycol, DMSO : dymethyl sulfoxide, PrOH : propylène glycol, HSA : albumine de sérum humain, SVF : sérum de veau fœtal, T°A : température ambiante

Revue de la littérature

3. Résultats après congélation du cortex ovarien

Nous avons vu précédemment qu'à l'heure actuelle plus d'une centaine de grossesses ont pu être obtenues après congélation de cortex ovarien suivie d'une greffe. La majorité d'entre elles a été obtenue grâce à la technique de congélation lente³¹ et rares sont celles obtenues après la technique de vitrification probablement à cause de son utilisation récente⁶⁸. De plus, de façon intéressante, aucune naissance vivante n'a pour l'instant été obtenue après greffe de cortex ovarien prélevé chez une patiente prépubère⁹. Les deux raisons que l'on peut probablement imputer sont : (i) la relative jeunesse de la technique et de son autorisation font que la majorité des jeunes filles qui ont congelé leur tissu ovarien au début des années 2000 n'ont pas encore de désir d'enfant, (ii) dans certains cas la fertilité des patientes n'a pas été altérée par le traitement oncologique et une grossesse sans l'utilisation du tissus congelé a pu être obtenue⁹.

a. Survie des follicules primordiaux

Les follicules primordiaux constituent la réserve ovarienne des femmes et il est donc important que ceux-ci soient conservés en nombre suffisant lors du processus de congélation/décongélation afin d'offrir le maximum de chances de grossesses futures à ces patientes.

Aussi il semble que malgré les grossesses obtenues, la survie des follicules primordiaux soit grandement améliorable. Celle-ci est très variable dans la littérature et est estimée entre 60%^{70,73} et 80%⁶². Cette variabilité semble en partie être la conséquence de diverses méthodes de comptage des follicules primordiaux et de sa subjectivité. Certaines équipes préfèrent estimer la densité folliculaire en exprimant le nombre de follicules visualisés par mm² ou mm^{3 72}, d'autres effectuent un comptage globale des follicules et du pourcentage de follicule normaux ou anormaux sans tenir compte de la surface de l'ovaire⁶⁷.

b. Comparaison entre congélation lente et vitrification

A ce jour deux méta-analyses comparant la congélation lente du cortex ovarien avec la vitrification ont été publiées^{75,76}. Toutes ces études portaient sur des femmes pubères avec un âge moyen compris entre 27^{77} et 33,3 ans⁷⁸, la patiente la plus jeune inclue dans ces différentes études était âgée de 14 ans⁷⁹ et la plus âgée avait 41 ans^{73,78}. Les effectifs inclus étaient réduits, allant de 3 patientes pour Xiao *et. al*⁸⁰ à 26 pour Huang *et. al*⁸¹, pour une moyenne de 10,4 (146/14) patientes sur l'ensemble des études de la méta analyse de Shi *et al*.⁷⁵ Concernant la proportion de follicules primordiaux intacts il n'y avait pas de différence entre les deux techniques : Zhou *et al*. retrouvaient un Odds-Ratio (OR) = 1,228 ; 95% Intervalle de Confiance (IC) : 0,769-1,961 ; p = 0,390 et Shi *et al*. un

38

OR = 0,98 ; 95% IC : 0,74-1,28 ; p = 0,86. Il en était de même pour la densité en follicules primordiaux (OR = 3,44 ; 95% IC : -5,09-11,98 ; p = 0,43)⁷⁵. Cependant la vitrification semble être supérieure à la congélation lente en ce qui concerne la fragmentation de l'ADN des follicules primordiaux et la proportion de cellules stromales intactes, ces deux dernières analyses ayant été réalisées sur un faible nombre d'études (n=6 et n=4 respectivement)⁷⁵.

La comparaison entre les deux techniques reste cependant difficile car comme montré précédemment dans le Tableau 8, il existe une très forte hétérogénéité des procédures de vitrification pouvant expliquer des résultats parfois très variables entre les équipes. De plus le type de patientes inclues dans les différentes études est très hétérogène. Il peut s'agir de patientes saines ayant subi une ovariectomie dans le cadre d'un changement de sexe⁷⁴ ou ayant donné leur consentement pour réaliser une biopsie de l'ovaire en dehors d'une pathologie⁷³. Ou alors, de patientes opérées pour un kyste ovarien bénin^{62,70,82} le tissu prélevé proche du kyste pouvant être altéré par une pathologie sous-jacente comme de l'endométriose⁷⁰. Enfin il peut s'agir de patientes inclues dans un protocole de préservation de la fertilité dans le cadre d'une pathologie oncologique (lymphome, cancer du sein...), là aussi la pathologie ayant pu avoir un retentissement sur le tissu ovarien^{77,79,83}. Il résulte de cette diversité d'étiologies des résultats très différents en termes de densité de follicules primordiaux même pour les ovaires frais non congelés (groupes contrôles) pouvant varier de 0,7/mm² pour Sanfilippo et al.⁶² à 3,28±6,85/mm² pour Fabbri et al.⁷⁹. Cependant la raison qui semble le plus influencer ce paramètre est l'âge de la patiente. En effet il a été montré que la densité folliculaire diminuait très rapidement avec l'âge et passait de 20,36±19,03/mm² chez les patientes \leq 7 ans à seulement 1,63±3,35/mm² chez les femmes de plus de 15 ans⁸⁴.

IV. LES HYDROGELS

A. Définition

Les hydrogels sont des structures tridimensionnelles de nature insoluble produites après réticulation d'homopolymères, de copolymères ou de macromères⁸⁵. Ils forment ainsi des réseaux tridimensionnels hydrophiles qui ont une affinité forte avec l'eau et sont donc capables d'absorber de grandes quantités de milieux aqueux. Cette propriété leur est fournie par la présence de réticulations physiques ou chimiques⁸⁶.

B. La synthèse

Une des capacités principales d'un hydrogel est sa faculté à gonfler en milieu aqueux. Celle-ci dépend de plusieurs paramètres liés à l'hydrogel mais aussi du milieu dans lequel il est utilisé.

Les paramètres liés à l'hydrogel impliqués sont : (i) le type de polymère utilisé lors de sa synthèse, (ii) le type d'agent réticulant et le degré de réticulation⁸⁷. En ce qui concerne le milieu dans lequel le gel sera immergé, le taux de gonflement dépend de son pH, de sa charge globale, de son osmolarité etc...⁸⁸ Tous ces paramètres sont autant de variables d'ajustement qui permettent de fabriquer un hydrogel avec des caractéristiques voulues, précises et adaptées au type d'utilisation souhaitée (Figure 15).



Figure 15 : Facteurs influençant le gonflement d'un hydrogel en milieu aqueux

1. Les types de polymères utilisés

Deux types de polymères peuvent être utilisés : les polymères synthétiques et les polymères d'origine naturelle, les plus répandus sont présentés dans le Tableau 9.

Polymères synthétiques	Polymères naturels
Poly(ethylene glycol) (PEG)	Gélatine
Poly(acrylic acid)	Alginate
Polyacrylamide	Chitosan
Poly(vinyl alcohol)	Collagène
Poly(hydroxyethyl methacrylate)	Acide hyaluronic
Poly(N-isopropylacrylmide)	Fibrine
	Pullulane
	Dextrane

Tableau 9 : Liste des principaux polymères utilisés pour la formation d'hydrogels

Les polymères synthétiques sont d'origine non biologique ce qui rend leur production relativement aisée et reproductible. Les hydrogels à base de poly(ethylène glycol) (PEG) sont les plus répandus dans cette catégorie du fait qu'ils soient non toxiques et non immunogènes⁸⁸.

Les polymères naturels ont la particularité d'être biocompatibles par nature et leur utilisation est donc privilégiée dans le domaine de la biologie ou de la médecine. Certains d'entre eux sont des constituants de la matrice extracellulaire comme le collagène, la fibrine ou l'acide hyaluronique⁸⁹. D'autres appartiennent à la famille des polysaccharides qui sont des polymères d'unités saccharidiques identiques (homo-polysaccharides) ou diverses (hétéro-polysaccharides). Ils peuvent être liés de façon linéaire ou ramifiés.

Parmi eux le dextrane est un homo-polysaccharide de D-glucose reliés entre eux par des liaisons α -1,6 et ramifiés par des liaisons α -1,3 (plus rarement α -1,2 ou α -1,4) (Figure 16). Il est synthétisé à partir du sucrose par les enzymes des bactéries *Leucomostoc mesenteroides* et *Streptococcus mutans*, mais il peut être aussi formé par certains *Acetobacer* à partir de la dextrine⁹⁰. Il possède aussi la caractéristique d'être biodégradable par les dextranases, enzymes du tractus gastro-intestinal et de la salive. Sa biocompatibilité a été éprouvée car il a été utilisé en application clinique comme soluté de remplissage et a aussi montré des effets anti-thrombotiques⁹¹.



Figure 16 : Structure chimique du dextrane. Les molécules de D-glucose sont liées linéairement par des liaisons α-1,6 cibles de la dextranase. Les ramifications se font majoritairement par des liaisons α-1,3.

2. La formation de l'hydrogel

La réticulation, c'est à dire la capacité à former des ponts entre les différents composés chimiques, est un facteur qui va influencer la taille des pores obtenus et par conséquent ses propriétés de gonflement en milieu aqueux. Cette réticulation permet la formation d'un réseau de polymère tridimensionnel stable.

Il existe trois paramètres pour caractériser ce réseau : (i) le poids moléculaire moyen des chaines de polymères entre deux points voisins de réticulation noté Mc, (ii) la taille moyenne des mailles entre les chaines appelée ξ et (iii) le volume de liquide absorbé et retenu par l'hydrogel $(v_{2,s})^{87,88,92}$. Ces 3 paramètres sont liés les uns aux autres et définissent le taux de réticulation d'un hydrogel (Figure 17).

Il existe deux méthodes de réticulation, la réticulation physique et la réticulation chimique.

Les réticulations physiques ont pour particularité d'être non permanentes. On peut citer en exemple les enchevêtrement physiques, la formation de zones cristallines ou les interaction faibles comme les liaisons hydrogènes⁹². Les liaisons ainsi créées sont suffisantes pour éviter la dissolution de l'hydrogel en milieu aqueux. Il existe plusieurs méthodes de réticulation par exemple la congélation/décongélation ou les interactions hydrophobes. Les autres méthodes de réticulation physique sont présentées Tableau 10.

Réticulation physique	Réticulation chimique
Congélation/décongélation ⁹³	Agents réticulants ^{97–99}
Formation de zones cristalines ⁹⁴	Greffe chimique ¹⁰⁰
Interactions ioniques ⁹⁵	Réaction enzymatique ¹⁰¹
Interactions non-covalentes ⁹⁶	Radiation hautes énergie ¹⁰²
Liaisons hydrogènes ⁹⁷	Radicalaire ¹⁰³





Figure 17 : Schéma d'un hydrogel réticulé (adapté de Laughter et al. et Zhu et al.^{92,104}).
En violet sont représentées les chaines de polymères, les points verts représentent les liaisons entre les chaines de polymère. Mc est le poids moléculaire du polymère entre 2 liaisons. Ξ est la taille des mailles entre les chaines de polymères. Ici, ξ_{moyen}=(ξ₁+ ξ₂+ ξ₃)/3; Mc_{moyen}=(Mc₁+Mc₂+Mc₃)/3

Au contraire de la réticulation physique, la *réticulation chimique* produit des liaisons covalentes donc irréversibles entres les polymères. La méthode la plus courante pour ce type de réticulation utilise ce que l'on appelle des agents réticulants. Ce sont des petites molécules comme la génepine ou le sodium trimétaphosphate (STMP)^{98,105} qui vont former des ponts irréversibles entres les chaines de polymères. La réticulation chimique est donc plus stable dans le temps que la réticulation physique. Nous avons utilisé dans ce travail comme agent réticulant, le STMP. Cet agent a l'avantage d'être de grade alimentaire, et permet donc une réticulation par liaison covalente sans nuire à l'innocuité de l'hydrogel. Il existe d'autres méthodes de réticulation chimiques présentées Tableau 10.

C. Applications

Le type de polymère utilisé ainsi que le type et le degré de réticulation permet la formulation de divers types d'hydrogels biocompatibles et/ou biodégradables. Ceux-ci ont montré leur intérêt dans de nombreux domaines de la biologie ou de la médecine où ils sont utilisés sous divers formes (matrices, poudres, encapsulé, nanoparticules etc..).

1. Principales applications

L'ingénierie tissulaire est le domaine de prédilection des hydrogels, en effet ils ont été utilisés à cet effet de nombreuses façons et avec des objectifs variés. Sous formes de matrices tridimensionnelles biocompatibles ils peuvent mimer la matrice extracellulaire et être le support de la multiplication cellulaire afin remplacer ou réparer un tissu¹⁰⁶. Un autre domaine où les applications des hydrogels sont variées est la libération de molécules pharmaceutiques. En effet ils permettent une libération contrôlée et ciblée de molécules sous forme injectable^{107–109} ou par contact (lentilles de contact)¹¹⁰. D'autres applications sont exposées Figure 18.



Figure 18 : Principales applications des hydrogels

Revue de la littérature

2. Application en congélation

Nous avons vu précédemment que les hydrogels peuvent être formés de polysaccharides comme dans le dextrane (répétition de motifs D-glucose). Aussi, les différentes techniques de congélation ont recours à des cryoprotecteurs pénétrants et non pénétrants afin de prévenir la formation de cristaux intracellulaires. Les cryoprotecteurs non pénétrants sont majoritairement des sucres ou des polymères et permettent de réduire les concentrations utilisées en cryoprotecteurs pénétrant afin de limiter leur toxicité. Le dextrane a d'ailleurs déjà démontré sa capacité cryoprotectrice dans la congélation de cellules souches dérivées d'adipocytes¹¹¹, de globules rouges¹¹² ou de tissus comme la cornée¹¹³. Il est donc envisageable que les hydrogels notamment ceux à base de polysaccharides aient leur place dans les différentes techniques de congélation (congélation lente ou vitrification).

Les mécanismes permettant aux hydrogels d'avoir un rôle cryoprotecteur semblent cependant aller au-delà de leur composition et de leur capacité d'absorption, celle-ci entrainant un gradient osmotique intra- *vs* extracellulaire favorisant la déshydration des cellules. En effet, la manière dont ils sont chargés négativement et positivement pourrait jouer un rôle important^{114,115} notamment dans la protection des membranes cellulaires par « l'extérieur »¹¹⁶.

A ce jour plusieurs équipes se sont déjà intéressées à la congélation de divers types cellulaires en utilisant des cryoprotecteurs classiques (pénétrants ou non) associés à des hydrogels (Tableau 11).

Publication	Hydrogel	Support	Méthode	Type de cong.	Vol.	Cryoprtecteurs	Types de cel. congelées
Huang <i>et al.</i> ¹¹⁷	Alginate	Paillettes Micro-capillaires de quartz	Micro-encapsulation	Vitrification	250μL 2,5μL	2M PrOH + 1,3M tréhalose 1,5M PrOH + 0,5M tréhalose	Cellules souches embryonnaires de souris et cellules souches dérivées d'adipocytes humains
Serra <i>et al.</i> ¹¹⁸	Alginate	Cytodex3 microcarriers + Matrigel	Micro-encapsulation	Congélation lente	N.C	10% DMSO	Cellules souches embryonnaires humaines
Mumaw <i>et al.</i> ¹¹⁹	Hydrogel de polyethylene glycol	N.C	Micro-encapsulation	-80°C 4 à 24h puis azote liquide	N.C	10% DMSO + 0,05M tréhalose	Cellules souches mésenchymateuses bovines et porcines
Chen <i>et al.</i> ¹²⁰	Alginate	Cryotube	Micro-encapsulation	-80°C (descente contrôlée -1°C/min)	2mL	10% DMSO + tréhalose	llots pancréatiques de rats
Jain <i>et al.</i> ¹¹⁶	Dextrane 70kDA	Cryotube	azide-amino-dextran polyampholyte hydrogel azide-amino- dextran polyampholyte	-80°C	1,9mL 1mL	Aucun	Cellules murines L929
Perteghella <i>et</i> al. ¹²¹	Alginate	Paillettes	Micro-encapsulation	Congélation lente	0,5mL	Aucun	Spermatozoïdes de Buffle d'eau et de taureau
Liu <i>et al.</i> ¹²²	Alginate	Paillettes	Micro-encapsulation	Vitrification	0,3mL	1M DMSO + 1M EG + 1,3M tréhalose + Fe ₃ O ₄ nanoparticules	Cellules souches dérives d'adipocytes de porc
Zeng <i>et al.</i> ¹²³	Boc-O- dodecyl-L- tyrosine methyl ester	Cryotube	Gel dissous dans RPMI 1640	-80°C (descente contrôlée -1°C/min)	2mL	DMSO	Cellules de phéochromocytome de rat (PC12) et cellules de Schwann (RSC96)
Zhang <i>et al.</i> ⁵²	Alginate	Micro-capillaires de quartz	Micro-encapsulation	Vitrification	5μL	10% DMSO	Cellules mésenchymateuses de souris drivées de cellules embryonnaires
Zhao <i>et al.</i> 95	Alginate	Paillettes	Encapsulation (>500µm)	Vitrification	0,3mL	1M PrOH + 1M EG + 10% dextrane + 0,1M tréhalose	Cellules souches dérives d'adipocytes de porc

Tableau 11 : Etudes relatant de la congélation à l'aide d'hydrogels

Cel. : cellules, Cong. : congélation, Vol. : volume

Revue de la littérature

A titre d'exemple Huang *et al.* ont appliqué la vitrification de cellules souches embryonnaires murines et dérivées d'adipocytes humains en combinant un hydrogel à base d'alginate et l'utilisation de PrOH (1,5M) et de tréhalose (0,5M) à des doses plus faibles qu'habituellement utilisées en vitrification. Ils ont pour cela utilisé une technique d'encapsulation des cellules avec un hydrogel d'alginate et obtenu des résultats encourageants avec un taux de survie cellulaire proche de 80%. Ils ont notamment été capables d'utiliser avec succès des paillettes de congélation classique d'environ 250µL ce qui représente un volume élevé pour une technique de vitrification. Aussi, Serra et al. ont utilisé des micro-capsules d'hydrogel d'alginate associé à 10% de DMSO afin de congeler (congélation lente) avec succès des cellules souches embryonnaires humaines¹¹⁸. A l'étude des différents travaux publiés dans ce domaine il semble qu'aucune équipe ne se soit encore intéressée à la congélation de tissu entier ou fragmenté en solution. De plus la technique de micro-encapsulation qui semble être privilégiée, est techniquement longue et compliquée de par la nécessité d'une étape de dégradation enzymatique puis de centrifugation après décongélation. Celles-ci sont indispensables pour récupérer les cellules congelées avec cette technique.

Il pourrait donc être intéressant d'utiliser un hydrogel directement présent dans la solution de congélation afin de simplifier ces techniques.

V. CONCLUSION ET OBJECTIFS

L'ovaire est un organe histologiquement complexe. En effet il assure une fonction endocrine le rendant indispensable à l'induction de la puberté. De plus, il est le siège de l'ovogenèse et de la folliculogenèse permettant l'expulsion d'un ovocyte fécondable. Les follicules qu'il contient à la naissance et qui sont produits pendant la période intra-utérine constituent la réserve ovarienne qui décroit jusqu'à la ménopause.

Il est actuellement proposé aux jeunes filles prépubères avant un traitement potentiellement gonadotoxique de conserver cette réserve de follicules primordiaux en effectuant une congélation de de cortex ovarien. Cette congélation nécessite l'utilisation de cryoprotecteurs pénétrants dont la toxicité cellulaire a été démontrée à fortes concentrations ou lors d'une exposition prolongée. La technique de référence actuellement utilisée est la technique de congélation lente qui a été optimisée durant plusieurs années. L'autre technique, la vitrification dont le principe réside dans l'absence de formation de cristaux lors de la descente en température est encore récente dans cette application et sa supériorité est encore à démontrer par rapport à la congélation lente. De plus il n'existe pas encore de protocole standardisé pour cette technique et les procédures décrites dans la littérature sont très hétérogènes.

Nous avons vu que les hydrogels naturels basés sur des polysaccharides pourraient être utilisés en congélation afin de diminuer les concentrations en cryoprotecteurs pénétrants.

Aussi, une des thématiques principales du LVTS, équipe « Bio-ingénierie Cardio-Vasculaire pour la thérapie et l'imagerie médicale » dirigée par Didier Letourneur est de développer des biomatériaux dans diverses applications médicales. L'équipe a notamment développé un hydrogel à base de dextrane, biocompatible et biodégradable conçu pour l'ingénierie cellulaire et tissulaire⁹⁸. Ce dernier a fait l'objet d'un brevet déposé en 2013³. Pour obtenir cet hydrogel, du dextrane de grade clinque est réticulé en présence d'un agent non toxique le sodium trimetaphosphate (STMP) sans ajout de solvant, il est ensuite broyé afin d'obtenir une poudre qui gonfle en milieu aqueux¹²⁴. Comme démontré précedement *in vivo* et *in vitro* cet hydrogel est compatible avec les cellules et tissus^{1,2,125}. De plus la forme de cet hydrogel permet de récupérer facilement les cellules et tissus contenus dans ce dernier par le simple ajout de milieu. L'hydrogel est alors dispersé puis filtré sans étape de dégradation enzymatique ou de centrifugation qui sont habituellement nécéssaires dans les techniques d'encapsulation¹²⁶. Au vu des propriétés physicochimiques des hydrogels, il a semblé interressant d'utiliser les hydrogels de dextrane comme cryoprotecteur non penétrants permettant a priori de surmonter les limitations liées aux concentrations maxima utilisées habituellement.

Notre travail avait plusieurs objectifs. Le premier était d'établir les caractéristiques physicochimques de cet hydrogel, de confirmer sa biocompatibilité et d'expérimenter son utilisation en congélation lente sur de fibroblastes de souris BALBc/3T3.

Une fois cette caractérisation effectuée et l'efficacité de l'hydrogel démontrée en congélation lente de ces cellules, nous avons voulu l'adapter à la congélation lente de cortex ovarien de souris qui, malgré les nouvelles techniques de vitrification, reste la technique de référence. Lors de cette étape plusieurs associations « hydrogel + cryoprotecteurs + milieu de congélation » ont été utilisées afin de les comparer à la méthode de référence utilisant 1,5M de DMSO.

La meilleure association « hydrogel + cryoprotecteurs + milieu de congélation » déterminée, nous avons alors mis au point, pour établir une preuve de concept, un modèle de greffe d'ovaire chez la souris après congélation/décongélation de celui-ci en utilisant notre hydrogel.

Partie 1 : Dextran-based hydrogel as a new tool for BALB/c 3T3 Cell Cryopreservation without dimethyl sulfoxide

Jessica Pereira, <u>Xavier Ferraretto</u>, Catherine Patrat and Anne Meddahi-Pellé Biopreservation and Biobanking Vol. 17, No. 1 13 Feb 2019 https://doi.org/10.1089/bio.2018.0034 Ainsi que nous l'avons vu précédemment dans la revue de la littérature, les polysaccharides sont utilisés comme cryoprotecteurs non-pénétrants^{111–113}, cependant la viabilité cellulaire tend à diminuer lorsque leur concentration augmente¹²⁷. Pour surmonter les limitations, nous avons évalué les capacités cryoprotectrices de polysaccharides, non pas sous forme soluble, mais se présentant sous forme d'hydrogels obtenus par réticulation chimique grâce à un agent biocompatible, le STMP ou sodium trimetaphosphate.

Pour cela nous avons décidé d'utiliser un polysaccharide biocompatible, disponible en grade clinique ou pharmacologique, le dextrane⁹¹. Nous avons synthétisé trois hydrogels à partir de celui-ci, en utilisant la même concentration en STMP (25% w/w), mais en faisant varier le poids moléculaire moyen des chaines de polysaccharide. Trois composés, les PSH₄₀, PSH₇₀ et PSH₅₀₀ ont donc été synthétisés à partir de dextrane de poids moléculaires de 40 KDa, 70 KDa et 500 KDa.

Le milieu de base utilisé pour la détermination des propriétés des PSHs ainsi que les études de cryopreservation a été le Voluven[®]. C'est un soluté de remplissage colloïde dont l'osmolarité est proche du sérum humain¹²⁸. De plus, il est utilisé en thérapie cellulaire comme milieu de base pour la congélation de cellules souches hématopoïétiques destinées à la greffe¹²⁹ et nous paraissait être un milieu approprié pour effectuer la congélation, l'objectif étant de développer un dispositif médical à usage clinique.

Les caractéristiques physicochimiques de ces composés ont été déterminées (taux de phosphate, taux de gonflement, osmolarité dans la solution de cryopréservation, granulométrie après gonflement et température de cristallisation). Toujours avec pour objectif, un passage en clinique, nous avons évalué la biocompatibilité des PSH₄₀, PSH₇₀ et PSH₅₀₀ en accord avec les standards ISO 10993-5 et 10993-123.

Enfin nous avons évalué ses capacités cryoprotectrices en utilisant un modèle cellulaire, les cellules BALB/c 3T3, et en faisant varier la concentration des PSHs dans le milieu de congélation ainsi que la concentration (0% à 10%) de DMSO, cryoprotecteur pénétrant utilisé classiquement en cryopreservation.

Ce travail a été publié dans *Biopreservation and Biobanking* sous le titre : « *Dextran-based hydrogel as a new tool for BALB/c 3T3 Cell Cryopreservation without dimethyl sulfoxide* » et est présenté sous forme d'article.

Dextran-based hydrogel as a new tool for BALB/c 3T3 Cell Cryopreservation without dimethyl sulfoxide

Biopreservation and Biobanking Vol. 17, No. 1 13 Feb 2019 https://doi.org/10.1089/bio.2018.0034

Jessica Pereira, Xavier Ferraretto, Catherine Patrat and Anne Meddahi-Pelle

Abstract

Introduction: Cryopreservation provides an efficient way to preserve cells for a broad range of medical applications, including cell therapy. In clinical practice, cells are frozen in solutions containing dimethyl sulfoxide (DMSO) cryoprotectant agents (CPAs) to reduce their damage during the cooling process. In the current cell preservation methods, polysaccharides such as dextran, a nonpenetrating CPA, are used. However, the cell viability decreases when the solution concentration in polysaccharides increases.

Materials and Methods: To overcome this limitation, we have developed a dextran-based hydrogel (PSH) as a new CPA. Three molecular weight PSHs (PSH₄₀, PSH₇₀, and PSH₅₀₀) were synthesized. The physicochemical characteristics of PSHs were studied. Then, their biocompatibility properties were studied in vitro in BALB/c 3T3 cells according to ISO standard 10993-5/12. Crystallization temperature (Tc), that is, ice-crystal formation, was determined using the thermocouple method. Finally, PSHs were used as CPAs in a slow freezing procedure of BALB/c 3T3 cells with Voluven[®] (Fresenius Kabi, Sèvres, France), and were compared with the DMSO procedure.

Results: Our results showed that PSHs were biocompatible and did not modify the osmolality of the Voluven[®] cryopreservation solution. PSHs decreased the Tc when compared with the DMSO procedure. Furthermore, without adding DMSO, PSH₅₀₀ cryopreserved the viability of BALB/c 3T3 cells, and the result was similar to that of the control conditions.

Conclusion: PSH₅₀₀ could represent an alternative to DMSO. It could be used as a new medical device while avoiding DMSO side effects on patients.

Keywords: cryopreservation, slow freezing, DMSO, dextran, hydrogel

I. INTRODUCTION

Cryopreservation is a key step in cell therapy in medicine. Nevertheless, the freezing process could be damaging for living organisms due to intra- and extracellular ice-crystal formation, inducing injury, and decreasing the cell viability and functionality^{56,130,131}. Slow freezing, based on a controlled decrease of temperature, is a widely used procedure in cell therapy for cell cryopreservation^{127,132,133}. The cell viability and functionality depend on the cell types, the choice of the cooling and thawing cycle, the cryoprotectant agents (CPAs), and the freezing medium^{130,134}. The cell cryoinjury could be related to the intra- and extracellular osmotic balance and the ice-crystal formation^{127,133}.

To reduce damage from freezing, CPAs are required. They lower the solution freezing point, decrease the effect of the cryopreservation medium itself, and reduce icecrystal formation, thus limiting cell damage¹³⁵. Two types of CPAs could be used, the intra- and extracellular CPAs⁴². The most clinically used intracellular CPA is dimethyl sulfoxide (DMSO)^{127,136}. However, several issues have been identified including cell toxicity when it is used at high concentrations^{48,137}. When the cell solution injection containing DMSO is directly grafted in a patient, adverse effects may occur, ranging from headaches, nausea to cardiac and/or respiratory arrest^{50,51,138,139}. Among nonpenetrating CPAs, polysaccharides are used to increase extracellular osmotic pressure, regulate cell dehydration during cooling, limit extracellular crystal formation by increasing the viscosity, and prevent rapid rehydration during warming¹⁴⁰. Dextran, a clinical-grade biocompatible polysaccharide, was added to commercial hypothermic or freezing solutions such as Perfadex[®] or CryoSolve^{TM 116,140,141}. However, the cell viability decreases for dextran concentrations higher than 400nM in solutions.

Hydrogels are 3D networks obtained after chemical or physical crosslinking. Among them, hydrophilic polymers can swell and retain a large amount of water, release drugs, and act as cell carriers or scaffolds for tissue engineering^{1,2,85,98,125,142–144}.

Hydrogel properties depend on their chemical structure conferred by the molecular weight (MW) of the polymer used, as well as the choice of the crosslinking agent¹⁴⁵. Thanks to their properties, hydrogels are widely used in different applications, including cell encapsulation, drugcontrolled release, and plaster in skin wound repair.

In previous studies, we have developed a dextran-based hydrogel (PSH) for cell and vascular tissue engineering^{2,98}. We have shown that PSHs were biocompatible, biodegradable in vitro and in vivo, and could act as a drug delivery platform^{2,98,143}. Based on these results and to overcome the

limitation of polysaccharides in the freezing solutions, we have developed new PSHs suitable for cell and tissue cryopreservation.

As the final purpose was to develop a new clinical device, we decided to use only clinical- or pharmaceutical-grade dextran in the synthesis. In this study, we synthesized three PSHs based on 40 kDa (PSH₄₀), 70 kDa (PSH₇₀), and 500 kDa (PSH₅₀₀) MW dextran. We studied their physicochemical characteristics and biocompatibility properties according to ISO standards 10993-5 and 10993-12. We then determined the crystallization temperature, that is, the ice-crystal formation of PSHs using the thermocouple method, with Voluven[®] (Fresenius Kabi, Sèvres, France), a clinical freezing solution containing 6% hydroxyethyl starch in a sodium chloride solution (0.9%) and 0% proteins. Finally, PSHs were used as CPAs both in the absence and in the presence of DMSO.

II. MATERIALS AND METHODS

Materials

Cell culture

Cell culture plastics and cryotubes were obtained from Corning (Fontenay-Sous-bois, France). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), minimum essential medium alpha, phosphatebuffered saline (PBS), Hank's balanced salt solution, fetal calf serum (FCS), antibiotic-antimycotic solution, and trypsin-EDTA were purchased from Gibco by Life Technologies (Carlsbad, CA). Trypan blue was purchased from Sigma (St. Louis, MO). DMSO was purchased from WAK-Chemie (Steinbach, Germany). Saline solution (NaCl 0.9%) was obtained from Laboratoire Aguettant (Lyon, France). Voluven[®] was purchased from Fresenius (Kabi, France SA).

Dextran-based hydrogel synthesis

Pharmaceutical-grade dextrans of different MWs (40, 70, and 500 kDa) were obtained from Pharmacosmos (Holbaek, Denmark). The other chemical products were obtained from Sigma.

Methods

PSH powder synthesis and characterization

PSH production

The PSH was prepared as previously described^{125,125}. First, polysaccharides were dissolved in water. The chemical crosslinking of polysaccharides was carried out in sodium hydroxide using the crosslinking agent, trisodium trimetaphosphate (STMP), at 25% (w/w, Sigma). The polysaccharides mixed with STMP were incubated at 50°C for 1 hour. The resulting PSH was washed thoroughly with PBS (pH 7.4) and crushed with a grinder (Grindomix, Retsch, France). It was dehydrated using ethanol/water baths and dried in an oven to constant weight. After a sieving step (AS 200, Retsch), the PSH (250–500 mm granulometry) was sterilized under UV light and kept at room temperature. For this study, three PSHs were synthesized from dextrans with clinical-grade MWs of 40, 70, and 500 kDa, and named, respectively, PSH₄₀, PSH₇₀, and PSH₅₀₀.

PSH phosphate content

As previously described, 50 mg of PSH powders (n = 9) was heated in 10% nitric solution at $105^{\circ}C^{98,125}$. Solutions of ammonium metavanadate and ammonium heptamolybdate were then

added to the dissolved PSH. Results were read at 405 nm absorbance with a spectrophotometer (Infinite M200 Pro, Tecan) and compared with the phosphate calibration curve to determine the phosphate concentration.

PSH swelling ratio determination

For the swelling ratio (SR), 10 mg of PSH_{40} , PSH_{70} , or PSH_{500} (n = 9) was swollen in 1mL of Voluven[®] with 0%, 2%, 5%, and 10% DMSO, or in saline solution at room temperature for 1 hour to obtain a final concentration of 10 mg/mL. The excess solution was then removed, and the SR was calculated using the following formula:

$$SR = \frac{PSHswelled(g) - PSHpowder(g)}{PSHpowder(g)}$$

PSH osmolality

PSH solution's osmolality (n = 3) was measured using a Micro-Osmometer Type 6[®] (Lôser Messentechnik, Berlin) according to the manufacturer's protocol. PSHs were swelled in Voluven[®] or Voluven/DMSO (10 mg/mL), and the supernatant's osmolality was measured after 1 hour at room temperature.

Particle size distribution in swollen PSH

The size distribution of PSH was determined by the light scattering technique using laser diffraction in a Mastersizer 3000 (Malvern). PSH (5 mg/mL, n = 3) was swollen in saline solution (NaCl 0.9%) or in Voluven, and added to the dispersion unit of the Mastersizer as described by the manufacturer.

Crystallization temperature determination

PSH powders were swollen in Voluven[®] (10, 20, or 40 mg/mL concentration) without or with 2%, 5%, or 10% of DMSO (n = 5). Temperature probes of a thermocouple (Multi-Channel Thermometer, Consort T851; Bioblock Scientific, Illkirch, France) were introduced in each sample. The tubes containing the probes were then placed in an automatic freezer (Freezal, Air Liquide, Courbevoie, France) set at a cooling rate of 2°C/min from 10°C to -40°C. The temperature decrease was automatically monitored until it reached -40°C. This reaction was exothermic, and the crystallization temperature (Tc) was the coldest temperature measured before the supercooling peak.

In vitro PSH evaluation

Cell culture

BALB/c 3T3 clone A31 cells (ATCC) were plated in a 75 cm² culture flask at $5 \cdot 103$ cells/cm², cultured in DMEM supplemented with 10% FCS (v/v) and 0.1% antibiotic-antimycotic (v/v) (complete medium or CM) at 37°C, 5% CO2, and changed every 2 days.

Biocompatibility of PSH determined by MTT assay

For this assay, 5 · 103 cells/cm2 BALB/c 3T3 clone A31 cells (ATTC, CCL-163[™]) were seeded in a 48-well plate in CM until 80% cell confluency. PSH extracts were prepared according to ISO 10993-5 and 10993-12 standards.29 PSHs (200 mg/mL, n = 6) were shortly incubated in CM for 24 hours in a humidified atmosphere containing 5% CO2 at 37°C. The supernatants were then recovered (pure extract or 100%) or diluted in complete culture medium (12.5% final concentration), according to ISO 10993-5 and 10993-12 standards, and added to the BALB/c 3T3 cell well plate. After 24 hours in culture, supernatants were removed, and the cells were washed twice using PBS. The evaluation of the cell viability was then carried out using thiazolyl blue tetrazolium bromide assay (MTT; Sigma) as recommended by the manufacturer. Complete culture medium (CM) and CM containing 10% DMSO were used as a positive or negative control. The cell viability was calculated as the percentage ratio of cell viability versus the positive control condition (CM).

Cell apoptosis evaluation by Annexin V determination

After 7 days of storage, sample vials were heated in a water bath at 37°C, and the solutions were filtered (40 mm cell strainer; Falcon; Fontenay-Sous-bois) to separate the cells from the PSH. The BALB/c 3T3 cell viability was then assessed using APC Annexin V Apoptosis flow cytometry Detection Kit with 7-AAD, according to the manufacturer's instructions (Ozyme, Biolegend, Montigny-Le-Bretonneux, France). In brief, after cell centrifugation (1200g, 5 minutes), the cells were incubated with APC Annexin V and 7- AAD in Annexin V Binding Buffer. After 15 minutes of incubation, the cell apoptosis was determined using a LSRII[®] cytometer (Becton Dickinson, Rungis Complexe, France). For each sample, >10,000 events were analyzed. The analyses were performed using the BD FACSDiva (Becton Dickinson) software. Results were expressed as the ratio of the CFCS.

Cell cryopreservation in PSH

BALB/c 3T3 cells, clone A31 (ATTC, CCL-163) were cryopreserved in Voluven[®] containing PSH₄₀, PSH₇₀, and PSH₅₀₀ in 0%, 2%, 5%, or 10% DMSO. A solution containing 90% FCS and 10% DMSO was used as the control (CFCS). For that purpose, PSH powder was swollen in cryopreservation

solutions (12 mg/mL final concentration), and 300,000 BALB/c 3T3 cells were added. For all samples, a slow freezing procedure was used (Freezal, Air Liquide, Courbevoie, France) according to the hospital biobank with a first cooling rate at 2°C/min from 10°C to -5.2°C where an automatic seeding was performed. The second cooling rate was 2°C/min to -40°C. The final rate was 10°C/min to -120°C. At the end of the freezing procedure, the samples were stored in liquid nitrogen.

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using one-way analysis of variance, followed by Tukey's and Dunnett's multiple comparison tests. Statistical tests were performed using GraphPad Software (version 6, La Jolla, CA). Differences were considered as being significant when p < 0.05.

III. RESULTS

PSH synthesis and characterization

The chemical synthesiswas carried out using pharmaceutical grade compounds. Three types of dextran-based hydrogels were obtained, PSH_{40} , PSH_{70} , and PSH_{500} , with a yield of PSH of 80%– 20% (n = 6 for each composition).

Phosphate content

A significant difference (p < 0.05) was observed between PSH_{500} and PSH_{40} (102.8 – 6.00 mM and 116.6 – 3.95 mM, respectively), while no significant difference was observed for PSH70 (Tableau 12).

			Character	rization		
				Swelling (%)		
	Phosphate (µM)	Saline	V - I	Voluven [®]	Voluven®	Voluven®
		solution	voluven®	+ 2% DMSO	+ 5% DMSO	+ 10% DMSO
PSH ₄₀	116 ± 3.95	1332 ± 219	937 ± 207 [#]	721 ± 72 ^{##}	713 ± 37 ^{##}	663 ± 55 ^{##}
PSH ₇₀	108.5 ± 2.15	1233 ± 113	901 ± 124 ^{##}	757 ± 98 ^{###}	648 ± 41 ^{###}	653 ± 32 ^{###}
PSH ₅₀₀	102.8 ± 6.00 *	939 ± 111	778 ± 127	702 ± 30 [#]	618 ± 37 ^{##}	636 ± 52 ^{##}

Tableau 12: Dextran-based hydrogel characterizations

 PSH_{40} , PSH_{70} and PSH_{500} were synthetized from clinical grade molecular weight dextran of 40 kDa; 70 kDa and 500 kDa respectively as previously described.24,25 Resulting PSH were crushed indoor to obtain a powder. PSH phosphate content and PSH swelling in saline solution or in clinical solution, i.e. Voluven[®] containing 0%, 2%, 5%, and 10% DMSO, were determined. Results were expressed as means ± SD, (n=9). Statistical analysis was performed by using ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * Comparison of phosphate content between PSH_{40} and PSH_{500} (p<0.05); # Comparison of PSHs swelling between Voluven[®] with or without DMSO to saline solution (# p<0.05; ## p<0.01; ### p<0.001). ANOVA : analysis of variance; DMSO : dymelthyl sulfoxide.

PSH swelling ratio and osmolality determination

The swelling of the PSH powder was studied in two different solutions, that is, saline solution and Voluven. As shown in Tableau 12, no significant difference was found between the PSHs in saline solution. When PSHs were swollen in Voluven, the SR significantly decreased in PSH₄₀ and PSH₇₀ (p < 0.01). No significant difference was observed for PSH₅₀₀. After adding 2%, 5%, and 10% DMSO in Voluven, the SR was at steady state regardless of the PSH MW. As shown in Tableau 13, the PSHs did not modify the osmolality. The osmolality of cryopreservation solutions increased significantly p < 0.05) after adding DMSO and depending on DMSO concentration. Similar results were observed when DMSO was added to the PSH cryopreservation solutions.

 Tableau 13: Osmolality (mOsm) of Voluven[®] solution containing PSH₄₀, PSH₇₀, PSH₅₀₀ and increasing DMSO concentration

	0% DMSO	2% DMSO	5% DMSO	10% DMSO
Voluven [®] (V)	253.67 ± 1.53	542.00 ± 3.46	991.33 ± 5.86	1942.33 ± 8.74
V+PSH ₄₀	263.67 ± 2.52	550.67 ± 6.81	1006.33 ± 6.43	1951.67 ± 1.53
V+PSH ₇₀	259.67 ± 1.15	546.00 ± 1.73	999.00 ± 2.65	1951.67 ± 1.53
V+PSH ₅₀₀	263.67 ± 1.53	548.00 ± 4.36	1001.00 ± 3.00	1970.33 ± 10.79

Each value represents the means \pm SD (n=3).

Particle size distribution in swollen PSH powder

Figure 19 shows the particle size distribution of PSH₄₀ (Figure 19a), PSH₇₀ (Figure 19b), and PSH₅₀₀ (Figure 19c) swollen in saline solution or in Voluven. The lower average size of the particles was between 310 mm (PSH₇₀ and PSH₅₀₀) and 352 mm (PSH40) in saline solution or in Voluven. In saline solution, 17% of the particles had an average size of 859 mm (PSH₄₀) and 756 mm (PSH₇₀). In Voluven, 19% of the particles had an average size of 756 mm (PSH₄₀) and 666 mm (PSH₇₀). In PSH₅₀₀, regardless of the solution, 12% of the particles had an average size of 860 mm. For all PSHs, the maximal average size was between 2200 and 3000 mm.



Figure 19: Size distribution of dextran-based hydrogel analysed using the Malvern Matersizer Microplus laser diffractometer technique.

PSH₄₀ (a), PSH₇₀ (b) and PSH₅₀₀ (c) size distribution analysis after swelling 5 mg/mL PSH in Voluven[®] (grey dotted line) and saline solution (NaCl 0.9%) (black line). The curve represents the size distribution defined as the percentage of each size in the total population. Each point of the curve represents the mean of three measurements of the same sample. The dotted vertical line indicates the minimum and maximum size of the most representative population of the sample.

Crystallization temperature determination

Tableau 14 shows the Tc determinations according to the PSHs and their concentrations using the thermocouple method during the slow freezing procedure. Without DMSO, PSHs at a concentration of 20mg/mL were able to significantly decrease the Tc (-11.14°C – 1.46°C PSH₄₀, p < 0.01; -7.8°C – 3.11°C PSH₇₀; -10.26°C – 2.17°C PSH₅₀₀, p < 0.05) when compared with the Voluven[®] (- 2.47°C – 0.43°C). A significant decrease of Tc was observed at a PSH concentration of 40mg/mL. Furthermore, PSH₅₀₀ in Voluven[®] decreased the Tc without any DMSO addition. To obtain a similar effect on Tc without PSH, the addition of 2% DMSO was needed in the Voluven[®] solution.

		DMSO					
		0%	2%	5%	10%		
Voluven [®] (V)		-2.47 ± 0.21	-12.32 ± 3.44 ***	-12.44 ± 1.52 ***	-16.76 ± 1.32 ***		
	V+PSH ₄₀	-8.1 ± 3.78	-7.86 ± 3.73	-10.32 ± 4.36 *	-11.2 ± 3.08 **		
10 mg/mL	V+PSH ₇₀	-6.23 ± 2.00	-7.6 ± 3.78	-7.08 ± 3.11	-10.22 ± 3.32 *		
	V+PSH ₅₀₀	-2.32 ± 1.33	-10.94 ± 2.44 **	-12.2 ± 3.37 ***	-13.9 ± 3.93 ***		
	V+PSH ₄₀	-11.14 ± 1.46 **	-12.28 ± 1.64 ***	-12.48 ± 3.89 ***	-12.18 ± 3.89 ***		
20 mg/mL	V+PSH ₇₀	-7.8 ± 3.11	-9.3 ± 2.38	-11.18 ± 2.30 **	-12.9 ± 3.29 ***		
	V+PSH ₅₀₀	-10.26 ± 2.17 *	-10.44 ± 5.13 *	-13.88 ± 1.85 ***	-14.36 ± 3.99 ***		
	V+PSH ₄₀	-10.3 ± 1.75 *	-12.98 ± 2.09 ***	-15.74 ± 0.38 ***	-14.84 ± 3.70 ***		
40 mg/mL	V+PSH ₇₀	-11.06 ± 1.66 **	-9.92 ± 0.54 *	-13.66 ± 4.43 ***	-13.9 ± 2.83 ***		
	V+PSH ₅₀₀	-12.68 ± 1.92 ***	-10.52 ± 1.78 *	-11.02 ± 6.31 **	-15.08 ± 1.25 ***		

Tableau 14: Crystallization Temperature, (Tc in °C) of Voluven[®] solution containing PSH₄₀, PSH₇₀, PSH₅₀₀ and increasing DMSO concentration.

Each value represents the means \pm SD of five experiments performed once. The results were compared to the control condition i.e Voluven® without PSH and without DMSO (bold values).* Statistical analyses were carried out using ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (* = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001).

In vitro PSH evaluation

PSH cell biocompatibility

The viability of BALB/C 3T3 cells after 24 hours of culture in the presence of PSH extracts was assessed by measuring the metabolic activity of F2c cells (Figure 20). As shown in Figure 20, all samples exhibited cell viability between 85% and 100% when compared with CM (control group).



Figure 20: Dextran-based hydrogel BALB/c 3T3 cell biocompatibility.

Cytotoxic effects of PSH₄₀ (dark grey bar), PSH₇₀ (clear grey bar) or PSH₅₀₀ (white bar) of PSH diluted extracts (12.5%) or PSH pure-extracts (100%) were evaluated on BALB/c 3T3, clone A31 cells (ATTC, CCL-163[™]) by MTT assay. Complete culture medium (CM) and CM containing 10% DMSO were used as a positive or negative control respectively. Results were expressed in percentage of cell viability as compared to the positive control (CM). (n=6/condition). Statistical analyses were performed by using ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (*** = p<0.001, NS = non-significant). According the ISO 10993-5 and 10993-12 29, samples were considered as being biocompatible above 70% of viability (dotted line).
Cell preservation after cryopreservation in PSH

PSH₅₀₀ used as a CPA without DMSO (Figure 21a) protected from apoptosis (2.1-fold, (p < 0.001) as compared with Voluven[®] alone. Interestingly, PSH₅₀₀ preserved cells from apoptosis regardless of DMSO concentration as compared with CFCS (1.20-fold; 0% DMSO [Figure 21a], 1.19; 2% DMSO [Figure 21b], 1.26; 5% DMSO [Figure 21c] and 1.1; 10% DMSO [Figure 21d]). When PSH₄₀ and PSH₇₀ were used as CPAs without DMSO, cells were protected from apoptosis as compared with Voluven[®] alone (1.6-fold [p < 0.01] and 1.3-fold, respectively). However, without DMSO, PSH₄₀ and PSH₇₀ exhibited lower protection than CFCS. Adding 2% or 5% DMSO to PSH₇₀ (Figure 21b, c) increased 1.4-fold the capacities of CPA to preserve cells. No significant difference was observed with PSH₄₀. Adding 10% of DMSO to PSHs did not modify the cell effects as compared with CFCS.



Figure 21: BALB/c 3T3 cell viability after cryopreservation in dextran-based hydrogel.

After cryopreservation of BALB/c 3T3 cells in Voluven[®] with PSH₄₀ (dark grey bar), PSH₇₀ (clear grey bar) or PSH₅₀₀ (white bar) at 40 mg/mL, or without PSH (black bar) and (a) 0%, (b) 2%, (c) 5% or (d) 10% DMSO, cell apoptosis was assessed by using APC Annexin V Apoptosis flow cytometry Detection Kit with 7-AAD. Results were expressed as a ratio of cell viability in experimental groups versus the control condition (90% FCS + 10% DMSO, dotted line). # compared the PSH to the control conditions and * compared the experimental conditions to each other. Statistical analyses were performed by using ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (* or # = p<0.05; ** or ## = P<0.01; *** = p<0.001).

IV. DISCUSSION

Currently, one of the main challenges of cell therapy and tissue transplantation lies in the quality of sample cryopreservation, which has a significant impact on successful grafting. The end-result of the cryopreservation depends on the CPA, the choice of a freezing protocol, and the selection of the cryopreservation solution. A large number of cryopreservation solutions used in cell therapy have been developed by cell transplant centers or by manufacturers. Polysaccharides in solution exhibit cryopreservation properties¹⁴⁶. However, their efficiency depends on their concentration in the solution. The higher the concentration, the lower the cell viability¹²⁷. To overcome this limitation, we have used polysaccharides in a hydrogel form. During the freezing process, the cells are usually embedded in the gel throughout the gel formation, by either chemical crosslinking or freezing processes^{147–149}. One limitation was represented by the production of uniform, reproducible, and stable capsules or a cellularized hydrogel without cell membrane damage¹⁴⁷. As reported in the literature, if cell separation from gel was needed, a gel enzymatic digestion step was performed before use, and could decrease the cell viability^{118,150–152}. Thanks to our process, cells could be easily retrieved by adding medium to the sample, dispersing them from the gel, as they were not embedded in a hydrogel capsule but surrounded by a swelling powder. Since the swelling gels exhibited a low gel particle size distribution (between 310 and 352 mm), a single filtration using a cell strainer (<200 mm) can be used to separate the cells from the gel, avoiding a centrifugation step and therefore decreasing cell damage. Furthermore, the limitation presented by the production of a uniform, reproducible, and stable capsule or a cellularized hydrogel without cell membrane damage during the process was overcome^{147,148,151,152}. In this study, we chose a slow freezing procedure for the cell therapy cryopreservation according to the Saint Louis Hospital Biobank procedures. This clinical standard protocol allowed the cryopreservation of a large volume of cells ranging from 20 to 150mL requested for cell therapy, and was not time-consuming for the operator. The osmolality of the solution is a key point in freezing because it could increase during ice-crystal formation and damage the cell by fast dehydration¹³⁵. The osmolality can be influenced by both the gel type and the freezing medium. To be able to set the pharmaceutical composition of the freezing solution, we used Voluven, a clinical cryopreservation solution^{128,153,154}. Voluven[®] meets the requirements of the U.S. Food and Drug Administration, and is compliant with European regulations. It does not contain any DMSO or CPA, and exhibits an osmolality similar to blood serum^{128,129}. In this study, we have shown that in Voluven, the osmolality of PSHs remains in the physiological range. As already observed, the osmolality of the solution containing PSHs increases if DMSO is added. Adding PSH₄₀, PSH₇₀, or PSH₅₀₀ did not influence the osmolality of the solution. Furthermore, thanks to their swelling properties,

PSHs may act like a sponge, allowing a slow rehydration and preventing hyperosmolality postthawing, which is harmful to the cell^{155,156}. As observed, all PSHs were able to swell in the cryopreservation solution. Hydrogel physical properties depend on their components and the concentration of the crosslinking agent during synthesis^{145,157,158}. Because the phosphate contents were similar in all PSHs, the differences observed in the swelling properties were related to the MWs of the PSHs. As observed with other gels, this could be explained by the spatial rearrangement linked to the configuration and the length of the polymer chains^{159,160}.

CPAs and polymers decreased the Tc, that is, the temperature of the first ice-crystal formation^{161–}¹⁶³. Evaluating the effect of PSHs on Tc values could help determine the optimal cryopreservation solution. Adding DMSO to PSH₄₀ and PSH₇₀ was needed to reach the Tc of the Voluven/DMSO solution. DMSO is the most clinically used CPA despite its side effects^{154,164}. Reducing the use of DMSO is still challenging, and several polymer solutions such as polyvinylpyrrolidone have been developed for that purpose¹⁶⁵. Interestingly, our results have shown that PSH₅₀₀ alone (40 mg/mL) decreases Tc similarly to the Voluven/ 2%–10% DMSO solutions.

Given that CPAs have been classified as medical devices, we performed biocompatibility studies according to EN ISO 10993-5 and 10993-12 standards. As observed, all PSHs were biocompatible, and the viability was >70% with pure extracts (87.27%- 2.44%, 99.16%- 3.06%, and 85.31%-6.00% for PSH₄₀, PSH₇₀, and PSH₅₀₀, respectively).

Based on these results, we compared the effects of PSHs (40 mg/mL) on BALB/c 3T3 cell viability after cryopreservation under standard conditions. Remarkably, PSH₅₀₀ without any DMSO addition cryopreserved the BALB/C 3T3 cell viability similarly to the standard procedure. Furthermore, the cryopreservation solution (PSH₅₀₀-Voluven) did not contain any FCS or human albumin, preventing the risks associated with human or animal by-products.

Numerous works have shown that polymers' efficiency in cryopreservation was related to the MW. An increase in MW increased the cryoprotective effect¹⁶⁶. Wang *et al.* showed that dextran 40 kDa incorporated into an alginate/gelatin hydrogel could have an effect on the cryopreservation of adipose stem cells by reducing the DMSO concentration. This effect goes through the increase in viscosity, and the reduction of the ice nucleation and crystal formation rate¹¹¹. Our findings were consistent with this, because the addition of at least 2% DMSO was required when freezing in the presence of PSH₄₀ or PSH₇₀. An increase in the dextran MW avoided DMSO addition, preventing cell membrane damage¹⁶⁷.

V. CONCLUSION

In conclusion, PSH_{500} seems to be an alternative to DMSO for cell preservation and could be used as a new medical device. In addition, PSH_{500} gel is reliable, and could be easily produced on a large scale at low cost. No new equipment or specific personnel training is required for cell cryopreservation. Further studies are in progress to better understand the cryoprotective effects of PSHs and their potential use in the long-term storage of cells.

Acknowledgments

The authors thank the Agence de la Biomédecine and the SATT Ile-de-France for their financial support, as well as Dr Anne Baudot and Pr Gerard Louis, Inserm 1148, Paris-Diderot University for allowing them to use the thermocouple instruments. They are grateful to Graciela Pavon-Djavid and Aicha Chouiakh for the discussions and the reading of this article.

Author Disclosure Statement

No conflicting financial interests exist.

Dans cette partie nous avons montré que le PSH₅₀₀, hydrogel synthétisé à partir de dextrane de poids moléculaire de 500KDa et réticulé avec du STMP (25% w/w), conserve des capacités cryoprotectrices dans la congélation lente de cellules BALBc/3T3, même en absence de DMSO. Il a de plus démontré sa biocompatibilité.

L'ensemble de ces étapes nous a donc permis de sélectionner le PSH₅₀₀ comme hydrogel le plus approprié à la congélation afin de le mettre en application dans la congélation lente d'ovaire de souris.

Le modèle de congélation de cortex ovarien de souris est très largement utilisé dans la littérature pour la mise au point et la comparaison de différentes techniques de congélation^{168–171}. Il était de plus simple à mettre en place au laboratoire LVTS (INSRM U1148) qui dispose d'une structure animalière adaptée.

Partie 2 : Congélation lente d'ovaires de souris avec le PSH₅₀₀

I. INTRODUCTION

Il existe en France depuis les années 80, comme dans tous les autres pays industrialisés, une augmentation de l'incidence des cancers chez les jeunes enfants d'environ 0,6% par an. Celle-ci est accompagnée d'une amélioration de la prise en charge de ces patients et des traitements qui ont augmenté de façon très importante leur espérance de vie¹². Une des conséquences de l'amélioration de l'espérance de vie après un cancer a mis en évidence des effets secondaires à long terme comme des problèmes d'hypo-fertilité, voire de stérilité totale secondaire aux traitements par radiothérapie, chimiothérapie et/ou chirurgicaux¹³. Afin de répondre à cela des techniques de préservation de la fertilité se sont développées comme la vitrification d'ovocytes matures ponctionnées après une hyperstimulation⁵, la maturation *in vitro* d'ovocytes immatures⁶ ou la congélation de fragments de cortex ovarien³⁵.

Cette dernière technique est la seule envisageable chez les jeunes femmes prépubère ou lorsqu'une hyperstimulation ovarienne est contre indiquée ou lorsque le traitement oncologique doit être mis en place en urgence. Deux méthodes de congélation de cortex ovarien qui existent actuellement sont la congélation lente⁷⁰, qui reste la technique de référence dans les dernières recommandations internationales de l'European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)¹⁷, et la vitrification⁶⁶ qui s'est développé récemment et toujours considérée comme expérimentale¹⁷.

Ces deux techniques nécessitent d'exposer les fragments de cortex ovarien à des cryoprotecteurs pénétrants dont le rôle et d'assurer une protection mécanique en abaissant la température de solidification de l'eau et en remplaçant l'eau intracellulaire empêchant alors la formation de cristaux intracellulaires létaux lors de la congéation⁴³. Parmi les plus couramment utilisés pour la congélation de cortex ovarien on retrouve diméthyl sulfoxyde (DMSO)^{30,35}, l'ethylène-glycol (EG)^{62,73} et le propylène-glycol (ou 1,2-propanediol (PrOH))^{62,63}. Cependant leur utilisation est loin d'être anodine. Il est démontré qu'ils peuvent être cytotoxiques lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations importantes (> 7,5%) ou lorsque le temps de contact entre les cellules et le cryprotecteur pénétrant est supérieur à 1 heure. En effet, le PrOH peut induire des dommages sur l'ADN sur des ovocytes de souris lorsqu'il est utilisé à de fortes concentrations (de 7,5 à 15%)⁴⁷. L'EG et le PrOH sont susceptibles d'entrainer des cassures des brins d'ADN de façon dose-dépendante⁴⁸. Le DMSO possède une certaine cytotoxicité : testé sur une lignée de cellules ovariennes de hamster, il induit une diminution de 50% des cellules viables à une concentration faible de 13,2mg/ml (environ 0,17M)

après 24 heures d'incubation⁴⁸, et à de fortes concentrations (20%) il provoque des dommages au niveau de la membrane plasmique et de l'ultrastructure des spermatozoïdes⁴⁹.

Afin de limiter les concentrations en cryoprotecteurs pénétrants utilisés, des cryoprotecteurs non pénétrants peuvent être ajoutées à la solution de congélation⁴³. Parmi eux on trouve le dextrane un polysaccharide naturel biocompatible qui a déjà été utilisé en clinique comme soluté de remplissage⁹¹. Il a la particularité de pouvoir être réticulé sous forme d'hydrogel⁹⁸. Notre laboratoire a développé le PSH₅₀₀, un hydrogel à base de dextrane de 500KDa réticulé avec 25% de STMP et qui s'est montré efficace dans la congélation de fibroblastes de souris en absence de DMSO (Partie 1).

L'objectif de notre étude était, après avoir décrit le procédé de synthèse du PSH₅₀₀, d'adapter son utilisation à la congélation lente de cortex ovarien en faisant varier les concentrations en DMSO présent dans le milieu de congélation et en comparant les résultats obtenus à la solution de référence utilisée dans la congélation d'ovaire de souris qui utilise 1,5M de DMSO^{169,172} ainsi qu'à un contrôle « frais » d'ovaire non congelé. Les critères d'évaluation utilisés pour estimer la survie après congélation/décongélation étaient ceux habituellement rapportés dans la littérature : (i) l'analyse histologique des follicules, (ii) la persistance d'une vascularisation corticale et (iii) l'apparition d'un phénomène d'apoptose.

II. MATERIELS ET METHODES

A. Synthèse de l'hydrogel : PSH₅₀₀

L'hydrogel utilisé pour la congélation des ovocytes de souris a été synthétisé à partir de dextrane 500KDa de grade pharmaceutique (Pharmacosmos, Danemark) et réticulé avec 25% (w/w) de sodium trimétaphosphate (STMP) (Sigma Aldrich Merck, Allemagne). La Figure 22 récapitule les différentes étapes de la synthèse du PSH₅₀₀ qui sont détaillées ci-après.



Figure 22 : Déférentes étapes de la synthèse du PSH₅₀₀

1. Réticulation du PSH₅₀₀

Cette étape a été réalisée à l'aide d'un Thermomix[®] (Vorwerk, Allemagne) afin de standardiser la procédure de synthèse. Tout d'abord le dextrane a été solubilisé dans de la soude à 1M à 55°C sous agitation lente pendant 6 minutes, perdant alors un proton au niveau de ses groupements alcool (R-OH) et formant alors des résidus alcoolates R-O⁻Na⁺. Puis le STMP à une

concentration de 25% (w/w), préalablement dissout dans de la soude 1M (ce qui permet l'ouverture du cycle STMP (formation de tripolyphosphate de sodium (STTP)), a été alors ajouté dans la solution de dextrane. L'ensemble étant de nouveau mis sous agitation à 55°C pendant 1 minute. La réticulation s'est faite alors par liaison du STTP aux résidus alcoolates du dextrane (Figure 23).



Figure 23: Mécanisme de réticulation des polysaccharides par le STMP en milieu alcalin. (A) Formation d'alcoolate, (B) ouverture du STMP, (C) réticulation ou dégradation en sodium tripolyphosphate (d'après Lack et al. 2007). R : groupement correspondant au dextrane, STMP : sodium trimétaphosphate, STTP : tripolyphosphate de sodium.

La réticulation terminée, le gel de PSH₅₀₀ a été ainsi obtenu puis broyé à une vitesse de 2000 rotations/minutes (rpm) (Thermomix[®], VorVick, Allemagne).

2. Lavage et séchage du PSH₅₀₀

Le PSH₅₀₀ obtenu a été lavé à l'aide de tamis et d'un tamiseur AL200 (Retsch[®], Allemagne) sous agitation (1mm/g) et à l'eau distillée jusqu'à obtenir un pH de la solution de sortie de lavage proche de 8 puis avec une solution de phosphate buffered saline 10x (PBS) (2 fois), du PBS 1x (4 fois),

et enfin du PBS 0,1x (5 fois). A la fin de ce processus, le pH de la solution de sortie de lavage devait être compris entre 7,3 et 7,4 (Figure 24).



Figure 24 : Lavage du PSH₅₀₀.

L'hydrogel est placé dans le tamis supérieur et la solution de lavage dans l'entonnoir. Le pH de la solution de lavage est mesuré en sortie des tamis.

La première étape de séchage de l'hydrogel PSH₅₀₀ a été réalisée à l'aide de bains successifs d'éthanol à 70% puis d'éthanol à 100%. Celui-ci a été progressivement déshydraté et est passé d'un aspect translucide à une couleur blanche, le volume des particules de gel a aussi diminué fortement puisqu'il a libéré progressivement l'eau retenue dans ses mailles. Les particules de PSH₅₀₀ ont été séchées plusieurs jours dans une étuve à 40° jusqu'à atteindre un poids constant. L'hydrogel PSH₅₀₀ a été considéré comme totalement sec lorsque son poids était stable durant 24 heures.

3. Broyage du PSH₅₀₀ et séparation de la poudre selon la granulométrie

Une fois les particules de PSH₅₀₀ totalement séchées, celles-ci ont été broyées pour obtenir une poudre. Cette étape a été réalisée à l'aide d'un broyeur à couteaux Grindomix GM 200 (Retsch, France) à 2000 rpm pendant 1 minute, puis 3000 rpm pendant 1 minute et enfin 4000 rpm pendant 1 minute.

Un tri granulométrique de la poudre de PSH₅₀₀ a été alors effectué afin de séparer les diverses fractions en fonction de la taille des grains. Pour cela, la poudre de PSH₅₀₀ a été déposée sur

une colonne de tamis de maillages décroissants (1000 μ m, 500 μ m, 250 μ m, 100 μ m et 50 μ m) sous agitation (2mm/g pendant 5minutes). Les poudres obtenues ont constitué le produit final et donc une banque d'hydrogel de PSH₅₀₀ de différentes granulométries. Dans cette étude nous avons utilisé un PSH₅₀₀ de granulométrie 250 μ m < Ø < 500 μ m.

4. Rendement de synthèse

Le rendement (%) de synthèse a été calculé en divisant la masse totale d'hydrogel obtenue à la fin de de l'étape de tri sur la masse initiale de dextrane et STMP utilisée pour la synthèse :

Rendement de synthèse (%) = $100 \times \frac{Masse finale après la synthèse (g)}{Masse initilae dextrane + STMP (g)}$

5. Stérilisation de l'hydrogel

L'hydrogel a été stérilisé aux ultra-violets pendant 30 minutes dans une boite stérile avant utilisation.

B. Expérimentation animale

1. Prélèvement des ovaires de souris

Des souris femelles âgées de 3 semaines de type B6D2F1 (Janvier Labs, St Berthevin, France), ont été placées en cage (4 maximum) avec nourriture et eau à volonté pour une période de stabulation de 1 semaine. A cette date, le prélèvement des ovaires a été effectué de la manière suivante : Après euthanasie par dislocation cervicale, l'abdomen a été désinfecté à la Chlorhexidine 0,2% puis une incision médiane en Y a été pratiquée. Après repérage de l'utérus pour situer les ovaires rapidement, celui-ci a été prélevé avec le tissu adipeux périphérique ainsi qu'une section de l'oviducte afin de préserver l'intégrité de l'organe (Figure 25).



Figure 25 : Image de l'appareil génital des souris femelle. La zone entourée en bleu est prélévé afin de préserver l'ovaire le plus possible durant la manipulation.

Le prélevement a été alors dissséqué dans du milieu de culture M2 (Sigma Aldrich Merck, Allemagne) à température ambiante sous loupe binoculaire (grossissement x20) (Leica, Allemagne) afin de séprarer l'ovaire du tissus adipeux périphérique et de l'oviducte (Figure 26). L'ovaire isolé a été ensuite rincé deux fois dans du milieu M2 à température ambiante. Il a été attribué soit au groupe « Frais » et directement fixé ou soit congelé. Un schéma récapitulatif des différentes interventions en fonctions des groupes d'inclusion est présenté Figure 27.



5mm

Figure 26 : (A) Image d'un ovaire avec son tissu adipeux et l'oviducte avant dissection, (B) image d'un ovaire isolé après dissection sous loupe binoculaire.



Figure 27 : Schéma récapitulatifs des différentes étapes de l'expérimentation animale.

2. Congélations des ovaires de souris

Pour les différentes solutions de congélation, les cryoprotecteurs ont été dilués dans un milieu basal tamponné (DMEM-F12 tamponné avec de l'HEPES, Sigma Aldrich Merck, Allemagne) afin de limiter les fluctuations de pH. Le PSH₅₀₀ (granulométrie de 250-500µm) a été utilisé à une concentration de 40mg/mL associé à 10% de SVF avec ou sans 0,5M de DMSO. La solution de congélation de référence contenait 1,5M de DMSO et 10% de SVF conformément à la littérature^{169,172,173}. Les quatre solutions de congélation utilisées sont décrites dans le Tableau 15.

Milieu basal	Cryoprotecteurs	Nom de la solution
DMEMF12	Aucun	DMEM
DMEMF12	DMSO 1,5M + 10% SVF	Ref
DMEMF12	PSH ₅₀₀ 40mg/mL+10% SVF	PSH ₅₀₀
DMEMF12	PSH ₅₀₀ 40mg/mL+10% SVF + 0,5M DMSO	PSH ₅₀₀ +DMSO

Tableau 15 : Solutions de congélation testées

DMSO : diméthyle sulfoxide, SVF : sérum de veau fœtal

Les ovaires ont été placés dans des Cryotubes[™] (Thermo Fisher Scientific, Danemark) contenant 400µL de solution de congélation et laissés dans un bain de glace en agitation lente pendant 30 minutes afin de laisser agir les cryoprotecteurs. Les Cryotubes[™] ont été ensuite placés dans un appareil de descente en température contrôlé de type Freezal[®] (Air Liquide, France).

La congélation lente des échantillons a été réalisée de la manière suivante : une première descente en température de +4°C à -7°C à -1°C par minute a été réalisée, suivie d'un plateau de 5 minutes à -7°C. Un seeding manuel ou induction manuelle de la cristallisation, a été provoqué en plongeant rapidement le fond des Cryotubes[™] dans de l'azote liquide. Puis, une descente en température de -7°C à -30°C à -0,3°C par minute a été effectuée, suivie d'une dernière descente en température plus rapide de -30°C à -150°C à -10°C par minute. Les Cryotubes[™] contenant les échantillons ont été ensuite plongés dans l'azote liquide (-196°C) et stockés 1 à 4 jours avant d'être décongelés.

3. Décongélations des ovaires de souris

Les Cryotubes[™] contenant les ovaires congelés ont été placés immédiatement après sortie de l'azote liquide, dans un bain marie à 37°C et laissés décongelés jusqu'au dernier cristal de glace visible à l'œil nu, puis traités en fonction de la solution de congélation utilisée de la manière suivante : Pour les ovaires congelés avec une solution contenant le PSH_{500} ou le PSH_{500} +DMSO, 400µL de milieu basal + 10% SVF ont été ajoutés dans le CryotubeTM à température ambiante afin de disperser le gel. Le contenu du CryotubeTM a ensuite été déversé dans une boite de Pétri et l'ovaire a été alors récupéré délicatement avec une pince puis placé 2 minutes à température ambiante dans du milieu basal + 10% SVF.

Pour la condition de référence notée « Ref », 400µL de milieu basal + 10% SVF a été ajouté dans le Cryotube[™]. Le contenu du Cryotube[™] a été ensuite déversé dans une boite de Pétri et l'ovaire a été alors récupéré délicatement et placé 2 minutes à température ambiante dans du milieu basal contenant 10% SVF et 0,75M DMSO, puis 2 minutes dans un bain contenant le milieu basal + 10% SVF sans DMSO.

Pour les ovaires congelés sans hydrogel ni cryoprotecteur (noté DMEM), le contenu du Cryotube[™] a été déversé dans une boite de Pétri et l'ovaire a été alors récupéré délicatement avec une pince puis placé 2 minutes à température ambiante dans du milieu basal.

4. Analyses histologiques des échantillons

Les ovaires après décongélation ou à l'état frais immédiatement après avoir été prélevés (groupe « Fresh ») ont été rincés deux fois dans du milieu M2, 0% SVF durant 2 minutes, puis placés dans 600µL de liquide de Bouin (Sigma Aldrich Merck, Allemagne) durant 10 heures à l'abri de la lumière. Les échantillons ont été ensuite rincés dans 25mL d'éthanol à 70% pendant 4 heures, avant d'être conservés à +4°C dans 500µL d'éthanol à 70% avant leur inclusion en paraffine pour une durée de 15 à 24 heures. Les ovaires fixés ont ensuite été déshydratés puis inclus en paraffine. Des coupes de 5µm ont ensuite été réalisées au centre de l'échantillon au microtome HM 340 (Thermo Fisher Scientific, Danemark). Au minimum 4 coupes sériées ont été déposées sur une lame SuperFrost®Plus (VWR®, Belgique). Chaque coupe permettait d'observer l'intégralité du cortex. Un total de 15 lames était réalisé par ovaire.

Avant coloration ou immunomarquage, les échantillons ont été déparaffinés (3 bains de 2 minutes de toluène) et réhydratés dans des bains d'éthanol de concentration décroissante (un bain de 2 minutes d'éthanol 100%, un second bain de 2 minutes d'éthanol à 95%, puis un dernier bain de 2 minutes à l'éthanol 70%).

a. Classification des follicules et analyse morphologique

Les coupes ont été incubées durant 15 minutes à l'obscurité avec la solution d'hématoxyline à 1g/L (Sigma Aldrich Merck, Allemagne), rincées abondamment à l'eau courante, puis incubées avec

83

la solution d'éosine à 99% (Sigma Aldrich Merck, Allemagne) pendant 5 minutes à l'obscurité. Les lames ont été ensuite rincées 30 secondes dans un premier bain d'éthanol 95% puis 2 minutes dans un second bain d'éthanol 95%. Les échantillons ont été ensuite déshydratés par immersion des lames dans des bains successifs de 2 minutes d'éthanol 75%, 95% puis 100%, puis placées dans 3 bains de toluène de deux minutes chacun. Enfin les coupes histologiques ont été montées entre lames et lamelles recouvrant l'intégralité des échantillons avec de l'Eukitt[®] (Sigma Aldrich Merck, Allemagne).

Les follicules primordiaux, primaires, secondaires et antraux ont été distingués à l'aide de la classification de Lundy *et al.* 1999¹⁷⁴. Les follicules primordiaux étaient constitués d'un ovocyte entouré d'une seule couche de cellules de la granulosa aplaties. Les follicules primaires étaient formés d'un ovocyte entouré d'une couche de cellules de la granulosa dont une ou plus avec un aspect cubique. Pour les follicules secondaires l'ovocyte était entouré de deux ou plusieurs couches de cellules cubiques de la granulosa. Les follicules antraux avaient une cavité au sein des cellules de la granulosa.

L'analyse morphologique des follicules a reposé sur la classification de Gandolfi *et al.* 2006⁷⁰. Afin d'être classé comme follicule intact ceux-ci devaient répondre au Grade I de cette classification. Soit pour les follicules primordiaux et primaires, avoir une forme sphérique avec une distribution régulière des cellules de la granulosa, l'ovocyte devait lui aussi être sphérique. Pour les follicules secondaires et antraux ils devaient présenter une forme sphérique avec peu ou pas d'espace entre les cellules. Les autres follicules dit altérés répondaient au Grade II et III de cette classification. Les follicules primordiaux et primaires avient des cellules de granulosa repoussées de la périphérie laissant apparaitre un espace et/ou un ovocyte irrégulier vacuolé. Pour les follicules secondaires et antraux ils avaient des cellules de la granulosa et/ou de la thèque altérées associées ou non à un ovocyte ayant perdu sa sphéricité (Figure 28).

Seuls les follicules avec un ovocyte identifiable en son centre ont été comptés. Pour chaque ovaire le décompte des follicules a été réalisé sur au moins 3 coupes successives. Pour chaque ovaire a été alors compté le nombre moyen par coupe de chaque type de follicule ainsi que son aspect (intact ou altéré). Aussi la surface des coupes était mesurée afin de pouvoir calculer la densité des follicules primordiaux intacts par mm².



Figure 28 : Classification morphologiques des follicules ovariens de souris.

De gauche à droite, les différents stades folliculaires de primordial à antral. De haut en bas, les grades I à III selon la classification de Gandolfi et al. 2006 avec les follicules de grade I sont considérés comme intacts, les follicules de grades II et II sont considérés comme altérés. Les flèches pointent les follicules correspondants (adapté de Youn et al. 2014).

b. Analyse de la vascularisation corticale

Cette analyse a été effectuée avec un marquage de la protéine CD31. C'est une protéine transmembranaire exprimée à la surface des cellules endothéliale constituant interne de la paroi des vaisseaux sanguins. Physiologiquement elle intervient dans la régulation de l'inflammation. Son marquage permet de mettre en évidence la paroi interne ou intima des vaisseaux sanguins.

Après déparaffinage et réhydratation, une étape de démasquage des sites antigéniques a été réalisée. Pour cela, les lames ont été placées pendant 15 minutes dans une solution Tris pH=9 (Dako, Danemark), diluée au $1/10^{eme}$ dans de l'eau distillée chauffée à 90°C, puis pendant 15 minutes dans la glace. Les lames ont ensuite été rincées dans de l'eau distillée puis dans une solution de Phosphate Buffer Saline (PBS, 1x) (Life Technlogies, Etats-Unis), puis placées 30 minutes dans de l'H₂O₂ à 3% à température ambiante, et enfin rincées deux fois 5 minutes dans du PBS 1x.

Afin d'éviter une fixation non spécifique de l'anticorps (Ac) primaire les échantillons ont été recouverts de Protein Block (Dako, Danemark) pendant 30 minutes, puis incubés avec l'Ac primaire anti-CD31 de lapin (Abcam, Royaume-uni) dilué au 1/2000^{ème} dans de l'Anticorps Diluant (Dako, Danemark) pendant tout la nuit à +4°C dans l'obscurité. Un contrôlé négatif était présent sur chaque

lame, correspondant à un échantillon non recouvert d'Ac primaire. Le lendemain les lames ont été rincées dans du PBS 1x avant d'être recouvertes de l'Ac secondaire Goat anti-rabbit IgG secondary Antibody, horseradish peroxidase (HRP) (Dako, Danemark) dilué au 1/10^{ème} dans du Tris Buffered Saline with Tween 20 (Dako, Danemark) + 1% SVF pendant 1 heure à température ambiante avant d'être rincées dans du PBS 1x. La révélation a été réalisée au diaminobenzidine (DAB) en recouvrant les échantillons avec la solution Liquid DAB+ Substrate (Dako, Danemark) durant 2 minutes puis les lames ont été rincées rapidement à l'eau distillée puis contre-colorées avec de l'hématoxyline à 1g/L (15 minutes à l'obscurité) et enfin lavées abondamment à l'eau courante. Les échantillons ont ensuite été déshydratés et les lames montées comme précédemment décrit.

Ont été identifiés comme vaisseaux corticaux uniquement les vaisseaux dont la continuité épithéliale était conservée (cellules épithéliales marquées jointes sur toute la périphérie de la lumière du vaisseau sanguin)¹⁶⁸. Leur décompte a été effectué sur au moins 3 coupes sériées d'un même ovaire. Le nombre moyen de vaisseaux comptés a ensuite été rapporté à la surface moyenne des coupes analysées¹⁷⁵.

c. Analyse de l'apoptose cellulaire

L'analyse de l'apoptose cellulaire a été réalisée avec un marquage de la caspase 3 clivée. Celle-ci est une protéine clef du mécanisme d'apoptose cellulaire. Elle est clivée et donc activée lors de la cascade apoptotique par les Caspases (8, 9 et 10). Une fois activée, elle clive à son tour les Caspases 6 et 7. Sa mise en évidence permet de montrer que la cellule est entrée en apoptose.

Le mode opératoire pour le marquage histologique de la Caspase 3 a été identique à celui du CD31. Les seules différences ont résidé dans la phase démasquage qui a été réalisée dans une solution Citrate pH=6 (Dako, Danemark) diluée au 1/50^{ème} dans de l'eau distillée. L'Ac primaire anti Caspase-3 clivée de lapin (Cell Signaling Technology, Etats-Unis) a été dilué au 1/200^{ème} dans de l'Anticorps Diluent puis incubé toute la nuit à +4°C dans l'obscurité.

Les cellules (cytoplasme ou noyau) colorées en marron étaient considérées comme positives. Lorsque qu'un follicule contenait une ou plusieurs cellules positives il était considéré comme apoptotique¹⁷⁵.

5. Acquisition d'une lame digitale

L'ensemble des lames colorées et marquées ont été scannées avec un NanoZoomer[®] (Hamatasu, Japon) au grossissement x400. Les lames digitales ont été analysées avec le logiciel de traitement d'image NanoZoomer Digital Pathology View version 2.0 (Hamatasu, Japon).

6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Prism[®] version 6 (GraphPad Software, Etats-Unis). Un test de variance ANOVA a été utilisé pour la comparaison de la densité en follicules primordiaux ou des vaisseaux sanguins, suivi d'un test de Tukey et Dunnet pour les comparaisons multiples. Un test du chi² a été utilisé pour les variables quantitatives (proportion de follicules intacts). Une valeur de p < 0,05 a été considérée comme significative.

III. RESULTATS

A. Rendement de la synthèse d'hydrogel

Pour la synthèse du lot de PSH₅₀₀ effectué pour ce travail, nous avons obtenu 121,6g de poudre sèche pour une masse initiale de 200g (150g de dextrane + 50g de STMP), soit un rendement de 60,8%. Sur la totalité de l'hydrogel synthétisé, nous avons obtenu 43,1g de poudre dont la granulométrie était comprise entre 250µm et 500µm (granulométrie utilisée pour la congélation des ovaires de souris). Les masses finales de PSH₅₀₀ obtenu en fonction des granulométries sont présentées Tableau 16. L'hydrogel sous forme de poudre sèche est présenté classé selon ses différentes granulométries Figure 29.

Masse initiale dextrane + STMP (g)	Granulométrie	Masse finale (g)	Rendement (%)
	Ø > 1000 μm	3,7	
	500 < Ø < 1000 μm	29,4	
	250 < Ø < 500 μm	43,1	
200	100 < Ø < 250 μm	36,8	60,8
	50 < Ø < 100 μm	7,8	
	Ø < 50 μm	0,8	
	Total	121,6	

Tableau 16	: Rendemen	t de synthèse	du PSH ₅₀₀
------------	------------	---------------	-----------------------

STMP : sodium trimétaphosphate



Figure 29: Différentes granulométries d'hydrogel obtenues après synthèse. Les granulométries sont présentées par ordre décroissant : (A) $\emptyset > 1000 \ \mu m$, (B) $500 < \emptyset < 1000 \ \mu m$, (C) $250 < \emptyset < 500 \ \mu m$, (D) $100 < \emptyset < 250 \ \mu m$, (E) $50 < \emptyset < 100 \ \mu m$, (F) $\emptyset < 50 \ \mu m$.

B. Classification des follicules et analyse morphologique

Un total de 32 ovaires a été analysé, sur 5 procédures de congélation/décongélation réalisées. Huit ovaires ont été attribués au groupe Fresh, 6 au groupe Ref, 7 au groupe PSH₅₀₀+DMSO, 6 au groupe PSH₅₀₀ et 5 au groupe DMEM. Six cent soixante-sept follicules ont été analysés : 245 dans le groupe Frais, 123 dans le groupe Ref, 205 dans le groupe PSH₅₀₀+DMSO.

L'aspect histologique des ovaires du groupe DMEM était altérée de façon importante ce qui explique le faible nombre de follicules ayant pu être analysés (n=18). Concernant le groupe PSH₅₀₀, l'aspect étant aussi altéré il n'a permis l'analyse que de 76 follicules (Figure 30).



Figure 30 : Coloration hématoxyline éosine des ovaires de souris des groupes Fresh, Ref, DMEM, PSH₅₀₀+DMSO et PSH₅₀₀.

Les barres d'échelles noires représentent 500µm et celles grises 50µm. Les flèches bleues indiquent des follicules primordiaux. Ref : DMSO 1,5M + 10% SVF, DMEM : DMEM seul, PSH₅₀₀+DMSO : PSH₅₀₀ 40mg/mL + 0,5M DMSO + 10% SVF ; PSH₅₀₀ : PSH₅₀₀ à 40mg/mL + 10% SVF.

En ce qui concerne la proportion du type de follicule dans chaque groupe, dans le groupe Fresh, 74,7% des follicules étaient classés comme primordiaux, 11% comme primaires, 7,3% comme secondaire et 6,9% comme antraux. Dans le groupe Ref, 74% étaient des follicules primordiaux, 14,6% des follicules primaires, 6,5% des follicules secondaires et 4,9% des follicules tertiaires. Enfin dans le groupe PSH₅₀₀+DMSO 78% étaient des follicules primaires, 12,7% des follicules secondaires, 4,9% des follicules tertiaires et 4,4% des follicules tertiaires. Cette répartition n'était pas significativement différente entre les 3 groupes (p=0,999) (Figure 31). Cette analyse n'a pas été réalisable pour les groupes DMEM et PSH₅₀₀ compte tenu du faible nombre de follicules analysés et de leur aspect morphologique très altéré.



Figure 31: Proportion de type de follicules des groupes Fresh, Ref et PSH₅₀₀. Les proportions de chaque type de follicule étaient comparables entre les groupes Frais, Ref et PSH PSH₅₀₀+DMSO (p=0,999). Ref : DMSO 1,5M + 10% SVF, PSH₅₀₀+DMSO : PSH₅₀₀ 40mg/mL + 0,5M DMSO + 10% SVF.

Le nombre de follicules intacts par type de follicule et par groupe est présenté Tableau 17. Le nombre total de follicules intacts dans les groupes DMEM et PSH₅₀₀ était significativement inférieur à celui des autres groupes, respectivement 0/18 (0%) et 3/76 (4%). Les nombres de follicules intacts dans les groupes Ref (68/123 ; 55,3%) et PSH₅₀₀+DMSO (126/205 ; 61,5%) étaient significativement inférieurs à ceux observés dans le groupe Fresh (216/245 ; 88,2%) (p<0,0001). Cependant le nombre total de follicules intacts et celui de follicules intacts par type n'étaient significativement pas différents entre les groupes Ref et PSH₅₀₀+DMSO (p>0,05).

Groupes	Fresh	Ref	PSH ₅₀₀ +DMSO	PSH ₅₀₀	DMEM
Ovaires	8	6	7	6	5
Follicules	Intacts/totaux (%)	Intacts/totaux (%)	Intacts/totaux (%)	Intacts/totaux (%)	Intacts/totaux (%)
Primordiaux	165/183 (90,2)	59/91 (64,8)****	107/160 (66,9)****	3/47 (6,4%)****	0/2 (0)****
Primaires	20/27 (74,1)	5/18 (27,8)**	12/26 (46,15)*	0/13 (0)****	0/2 (0)****
Secondaires	15/18 (83,3)	3/8 (37,5)*	4/10 (40)*	0/8 (0)****	0/6 (0)****
Tertiaires	16/17 (94,12)	1/6 (16,7)***	3/9 (33,3)***	0/8 (0)****	0/8 (0)****
Total	216/245 (88,2)	68/123 (55,3)****	126/205 (61,5)****	3/76 (4)****	0/18 (0)****

Tableau 17 : Nombre et proportion de follicules intacts par type de follicule et par groupe

*0,01 PSH_{500}+DMSO : PSH_{500} 40mg/mL + 0,5M DMSO + 10% SVF ; PSH_{500} : PSH_{500} à 40mg/mL + 10% SVF.

La densité de follicules primordiaux intacts était de $26,2\pm8,3/\text{mm}^2$ dans le groupe Frais, de 7,7 $\pm2,6/\text{mm}^2$ dans le groupe Ref et de $13,4\pm9,7/\text{mm}^2$ pour le groupe PSH₅₀₀+DMSO (Figure 32).





c. Analyse de la vascularisation corticale

Un total de 20 ovaires a été analysé. Cinq ovaires appartenaient au groupe Fresh, 4 au groupe Ref, 7 au groupe PSH₅₀₀+DMSO, 4 au groupe PSH₅₀₀. L'analyse du marquage du CD31 sur les ovaires du groupe DMEM n'a pas été réalisée compte tenu des résultats de l'analyse morphologique (Figure 33).



Figure 33 : Marquage de la proteïne CD31.

Les cellules endothéliales sont colorées en marron (flèches rouges). Les barres d'échelles représentent 100μ m. Ref : DMSO 1,5M + 10% SVF, PSH₅₀₀+DMSO : PSH₅₀₀ 40mg/mL + 0,5M DMSO + 10% SVF et PSH₅₀₀ : PSH₅₀₀ 40mg/mL + 10% SVF.

La densité en vaisseaux corticaux marqués au CD31 était de 29,1±3,9/mm² pour le groupe frais, de 19,1±1,7/mm² dans le groupe Ref, de 23,1±6/mm² dans le groupe PSH₅₀₀+DMSO et de 7,9±3,3/mm² dans le groupe PSH₅₀₀ (Figure 34). Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes Frais, Ref et PSH₅₀₀+DMSO (p>0,10). La densité en vaisseaux sanguins marqués par le CD31 dans le groupe PSH₅₀₀ était significativement inférieure à celle retrouvée dans les groupe Fresh, Ref et PSH₅₀₀+DMSO (p=0,022 ; p=0,011 et p=0,028 respectivement).



Figure 34 : Densité en vaisseau corticaux marqués par le CD31 (/mm²) en fonction du groupe. Ref : DMSO 1,5M + 10% SVF, PSH₅₀₀+DMSO : PSH₅₀₀ 40mg/mL + 0,5M DMSO + 10% SVF et PSH₅₀₀ : PSH₅₀₀ 40mg/mL + 10% SVF, ns : non significatif

D. Analyse de l'apoptose cellulaire

Un total de 23 ovaires a été analysé. Cinq ovaires appartenaient au groupe Fresh, 4 au groupe Ref, 6 au groupe PSH₅₀₀+DMSO, 5 au groupe PSH₅₀₀ et 3 dans le groupe DMEM. Concernant le groupe DMEM le marquage était diffus et concernait l'ensemble des ovaires. Pour les groupes Frais, Ref, PSH₅₀₀+DMSO et PSH₅₀₀ la caspase 3 clivée a été mise en évidence uniquement dans les cellules de la granulosa de follicules secondaires et tertiaires. Nous n'avons pas mis en évidence de marquage au niveau des ovocytes ou des cellules de la granulosa des follicules primordiaux et primaires dans ces 4 groupes (Figure 35).



Figure 35 : Marquage de la Caspase 3 clivée.

Les cellules en apoptose sont marquées en marron (flèches rouges). Les barres d'échelles noires représentent 100µm. Ref : DMSO 1,5M + 10% SVF, DMEM : DMEM seul, PSH500+DMSO : PSH500 40mg/mL + 0,5M DMSO + 10% SVF ; PSH500 : PSH500 à 40mg/mL + 10% SVF.

IV. DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons montré que le PSH_{500} utilisé à une concentration de 40mg/mL associé à 0,5M de DSMO et 10% de SVF (groupe PSH_{500} +DMSO) montrait des résultats en congélation lente équivalents à la solution de référence composée de 1,5M de DSMO et 10% de SVF^{169,172} (groupe Ref).

Nous avons choisi dans cette étude d'utiliser la technique de congélation lente. Tout d'abord car celle-ci reste la technique de référence pour la congélation de cortex ovarien dans les dernières recommandation de l'ESHRE¹⁷. La solution de référence utilisée dans notre étude a déjà fait ses preuves dans la littérature. Liu *et al.* ont obtenu des naissances de souriceaux après avoir greffé des ovaires congelés avec cette méthode de congélation lente¹⁷². Même si des techniques de vitrification se sont récemment développées le type et les concentrations en cryoprotecteurs varient de façon importante dans la littérature avec pour conséquence une absence de protocole standardisé^{62,66,79}. Deux méta-analyses récentes qui comparent la congélation lente et la vitrification de cortex ovarien n'ont pas démontré de différence significative en termes de survie des follicules primordiaux entre les deux techniques : Zhou *et al.* retrouvaient un Odds-Ratio (OR) = 1,228 ; 95% Intervalle de Confiance (IC) : 0,769-1,961 ; p = 0,390 et Shi *et al.* un OR = 0,98 ; 95% IC : 0,74-1,28 ; p = 0,86)^{75,76}.

La répartition folliculaire est considérée dans la littérature comme un marqueur d'une congélation bien conduite, elle est habituellement de l'ordre de 65 à 80 % de follicules primordiaux et de 10 à 20% de follicules primaires, les pourcentages restant étant des follicules secondaires ou antraux que cela soit chez l'humain¹⁷⁶ ou la souris B6D2F1¹⁶⁸ ou SCID¹⁷⁷ de 6 semaines. Cette répartition est identique, que les oviares aient été ou non congelés^{62,176} et si congelés, quelle que soit la technique de congélation, vitrification⁶² ou congélation lente¹⁷⁶. Les résultats que nous avons obtenus sont conformes à la littérature pour le groupe Fresh, Ref et PSH₅₀₀+DMSO : elles variaient de 74% à 78% pour les follicules primordiaux, de 11% à 14,6% pour les follicules primaires, 4,9% à 7,3% pour les follicules secondaires et de 4,4% à 6,9% pour les follicules tertiaires et n'étaient pas statistiquement différentes. Les proportions de follicules intacts (grade I) n'étaient pas significativement différentes entre les groupe Ref et PSH₅₀₀+DMSO (55,3% et 61,5% respectivement, p>0,05) mais elles étaient significativement inférieures au groupe Fresh, avant congélation (88,2%, p<0,0001). Il en était de même pour les proportions de follicules primordiaux intacts (grade I) qui étaient de 64,8% pour le groupe Ref vs 66,9% pour le groupe PSH₅₀₀+DMSO (p>0,05) mais là aussi significativement inférieures au groupe Fresh (90,2%, p<0,0001). Ces proportions étaient comparables à celles obtenues dans la littérature qui varient de 50,3%¹⁶⁸ à 76,9%¹⁵⁸ chez la souris. Le pourcentage de follicules intacts pour le groupe Frais est conforme à ceux décrits dans la littérature (proches de 90%) et témoin d'une bonne manipulation des ovaires lors des différentes étapes expérimentales¹⁷⁸. Cependant les résultats obtenus avec le PSH₅₀₀ seul (groupe PSH₅₀₀) montrent que nous n'avons pas été capables de se passer de l'utiliation du DMSO comme nous l'avions réalisé pour des fibroblastes de souris¹⁷⁹ ou comme cela a été décrit pour la conservation de cellules souches notamment grâce à l'encapsulation par hydrogel¹⁸⁰. Ceci est probablement lié à la complexité de la congélation d'un tissu qui est composé de divers types cellulaires et est relativement épais ce qui limite la pénétration des cryoprotecteurs. Actuellement, il semble que le seul tissu pouvant être congelé sans cryoprotecteur pénétrant soit la cornée dont la particularité est d'être très fine (0,5 à 0,6mm) et non vascularisée¹¹³.

La densité folliculaire, notamment en follicules primordiaux, est un indicateur intéressant. En effet il permet d'estimer la qualité de l'échantillon et sa potentielle utilisation pour une greffe ultérieure. Mais celui-ci peut être très variable d'une étude à l'autre y compris pour les ovaires frais non congelés^{62,79}. La raison principale pouvant expliquer cette variation a été décrite par Poirot *et al.* en 2002. En effet ils ont montré que l'âge impacte de façon très importante la densité des follicules primordiaux qui était de 20,36 \pm 19,03/mm² chez les patientes \leq 7 ans et de seulement 1,63±3,35/mm² chez les femmes de plus de 15 ans dans leur étude. Cela met en avant l'importance du phénomène d'atrésie folliculaire physiologique⁸⁴. De plus la densité folliculaire semble avoir une variabilité inter individuelle forte en plus d'être variable au sein d'un même ovaire¹⁷⁸. Cette diminution de la densité folliculaire liée à l'âge est à mettre en perspective avec la proportion de follicules primordiaux intacts post congélation/décongélation qui varie de 60 à 80% dans la littérature^{70,81}. La conséquence d'une diminution du nombre de follicules primordiaux causée par la congélation sera donc différente en fonction de l'âge de la patiente et de sa réserve ovarienne. C'est pour cela que l'ESHRE recommande de réserver cette technique aux femmes de moins de 36 ans avec une réserve ovarien suffisante i.e une hormone anti-mulherienne (AMH) \geq 0,5 ng/mL et un compte des follicules antraux \ge 5¹⁷. La combinaison de la densité des follicules primordiaux avec la proportion de follicules intacts par le calcul la densité de follicules primordiaux intacts après décongélation, comme nous l'avons réalisé dans cette étude, pourrait être un indicateur supplémentaire de succès d'une greffe.

Aussi, la prise d'une greffe suppose une intégration du tissu dans son environnement et donc le développement ou le maintien de la vascularisation du greffon³⁵. Il était donc indispensable de vérifier la densité des vaisseaux corticaux par un marquage du CD31. Celui-ci n'a pas montré de différence significative entre les groupes Fresh, Ref et PSH₅₀₀+DMSO (respectivement 29,1±3,9/mm2, 19,1±1,7/mm2 et 23,1±6/mm2, p>0,10). Seul le groupe PSH₅₀₀ présentait une densité vasculaire significativement inférieure aux 3 autres groupes. Ces résultats sont en accord avec Lee J *et al.* 2015

et 2016 qui montrent que la congélation (par vitrification pour ces études) ne modifie pas de façon significative la proportion de vaisseaux marqués par le CD31^{168,170}.

Le risque de la congélation lente est d'induire la formation de cristaux intracellulaires qui sont létaux pour les cellules. Il était donc nécessaire de rechercher les signes d'apoptose sur les ovaires congelés/décongelés en effectuant un marquage de la caspase 3 clivée. Nous avons mis en évidence pour les groupes Fresh, Ref, PSH₅₀₀ et PSH₅₀₀+DMSO un marquage seulement au niveau de rares follicules secondaires ou tertiaires. D'après la littérature on aurait pu s'attendre à environ 10% à 14% de follicules primordiaux présentant des signes d'apoptose dans les groupes Ref et PSH₅₀₀+DMSO et environ 3% dans le groupe Fresh¹⁷⁵. Le marquage a cependant montré de larges plages positives dans le groupe DMEM qui peut être considéré comme un contrôle positif. Une explication à l'absence de marquage des follicules primordiaux pourrait être liée au temps écoulé entre la décongélation et la fixation des ovaires potentiellement trop court pour pouvoir mettre en évidence une apoptose cellulaire. En effet les phénomènes d'apoptose ou de nécrose liés à la congélation peuvent être décalés jusqu'à 24 heures après la décongélation comme cela a été décrit par Baust et al. en 2006¹⁸¹. Dans ce sens, Kim et al. ont montré une diminution de l'ordre de 30 à 40% du nombre de follicules intacts après 9 jours de culture d'ovaires congelés/décongelés par congélation lente ou vitrifcation¹⁶⁹. Aussi, Lui et al. ont mis en évidence une diminution du nombre de follicules par ovaire après 14 jours de greffe, et cet effet était majoré pour les ovaires ayant été greffés après congélation/décongélation lente¹⁷². De plus, l'intégrité morphologique d'un tissu après décongélation n'est en aucun cas le reflet d'un maintien des fonctions du tissu^{178,181}. Afin de vérifier cette hypothèse et de permettre une évaluation des potentiels dommages induits par la congélation à moyen terme et du maintien des fonctions ovariennes il pourrait être intéressant de mettre en place un modèle de greffe d'ovaires de souris.

Autre point potentiellement limitant de notre étude : il concerne la durée de congélation des ovaires qui était de seulement 1 à 4 jours. Or les fragments de cortex ovarien en pratique clinique peuvent être conservés plusieurs années avant d'être utilisés notamment lorsque la congélation a été effectuée avant la puberté : la durée de conservation peut être de plusieurs dizaines d'année jusqu'à un éventuel désir de grossesse chez la patiente. On peut donc s'interroger sur l'impact de la durée de conservation à -196°C du tissu ovarien mais aussi des ovocytes qu'il contient. Plusieurs études se sont intéressées à la durée de conservation à -196°C et ses conséquences sur les ovocytes et le cortex ovarien. Concernant la durée de conservation des ovocytes congelés une étude menée sur la souris par Yan *et al.* en 2011 a montré une diminution significative des taux de survie, de fécondation et de blastulation lorsque des ovocytes vitrifiés étaient conservés entre 180 et 182 jours comparativement à ceux conservés entre 8 à 10 jours ou 90 à 92 jours¹⁸². Une autre étude publiée en

2015 sur des ovocytes humains montre une absence d'impact de la durée de conservation sur le profil d'expression génique¹⁸³. Aussi, aucune étude réalisée à grande échelle chez l'homme ne semble montrer un impact de la durée de la conservation d'ovocytes humains conservés dans l'azote liquide à -196°C sur leur survie après décongélation ou les taux de naissances vivantes après injection en ICSI¹⁸⁴. Enfin concernant le cortex ovarien une étude menée par Campos *et al.* en 2011 a comparé la viabilité folliculaire et la fonction endocrine de tissus ovariens conservés pendant 30 ou 180 jours et n'a pas mis en évidence de différences¹⁷⁸. Aussi von Wolf *et al.* rapportent dans une revue plusieurs succès de restauration de la fonction endocrine ou de la fertilité après des greffes d'ovaires effectuées après des durées de conservation variant de 6 mois à 8 ans¹⁵. Enfin, la durée de conservation de différentes études consacrées à la congélation expérimentale de cortex ovarien est très variable dans la littérature, elle peut être de 2 jours minimum sans limite supérieure de temps⁷⁰ à 3 mois maximum sans limite inférieure¹⁶⁹ ou tout simplement ne pas être renseignée⁷¹.

Outre des résultats comparables à la solution Ref dans la congélation de cortex ovarien lorsqu'il est associé à 0,5M de DMSO et 10% de SVF, le PSH₅₀₀ présente de nombreux avantages. Il est tout d'abord très simple d'utilisation. Contrairement à l'encapsulation par hydrogel qui a déjà été utilisée dans la congélation de plusieurs types cellulaires^{118,121} le PSH₅₀₀ est directement présent dans la solution de congélation. L'échantillon à congeler est simplement immergé dans l'hydrogel sans avoir recours à un procédé complexe comme l'encapsulation. Aussi après décongélation l'hydrogel est simplement dispersé par simple ajout de milieu de culture sans aucune étape préalable de dégradation enzymatique ni de centrifugation. Enfin, sa production est standardisée et une seule synthèse réalisée avec 150g de dextrane et 25g de STMP permet en théorie de congeler plus de 2600 échantillons. Le prix du dextrane de grade clinique étant d'environ 1000 euros les 150 grammes on peut estimer un coût d'environ 50 centimes par échantillon congelé.

Le rôle du PSH₅₀₀ dans la protection des tissus lors de la congélation est sans doute lié à de multiples mécanismes. Tout d'abord il est constitué de dextrane, un polysaccharide naturel et biocompatible qui a déjà fait ses preuves comme cryoprotecteur non pénétrant dans la conservation de cellules comme les globules rouges¹¹² mais aussi de tissus comme la cornée¹¹³. Dans notre étude nous avons utilisé le PSH₅₀₀, un hydrogel synthétisé à partir de dextrane réticulé par du STMP. Celui-ci forme alors un réseau tridimensionnel de mailles qui a une affinité forte avec l'eau et est capable d'absorber de grandes quantités de milieux aqueux⁸⁷. Cette capacité d'absorption et sa présence en solution entraine un gradient osmotique favorisant donc la déshydratation des cellules qui est une étape clef dans le processus de congélation⁵⁵. De plus il joue un rôle probable dans la protection des membranes cellulaires par « l'extérieur »¹¹⁶. Aussi sa présence directement en solution peut avoir

une influence durant le seeding en le potentialisant. En effet la nucléation des cristaux de glace s'effectue préférentiellement au niveau des particules présentes dans le milieu¹⁸⁵.

Le maillage dont il est constitué permet de piéger le cryoproteceur pénétrant puis de le libérer progressivement dans le milieu et donc d'exposer le tissu à des concentrations croissantes de DMSO durant le temps d'exposition comme cela a été démontré par notre équipe (données non publiées). Aussi, le PSH₅₀₀ nous a permis de diviser par trois les concentrations en DMSO comparativement à la solution Ref. La libération progressive du DMSO, couplée à une concentration beaucoup plus faible pourrait être un avantage de la solution PSH₅₀₀+DMSO par rapport à la solution Ref. En effet cela permettrait de limiter la cytotoxicité concentration- et temps-dépendante du DMSO ^{48,49} durant les 30 minutes d'équilibration pendant lesquelles l'ovaire est exposé avant la congélation.

V. CONCLUSION

Nous avons montré que le PSH₅₀₀ associé à 0,5M de DMSO et 10% de SVF (PSH₅₀₀+DMSO) présente des résultats comparables en termes de proportion et de densité de follicules intacts, totaux et primordiaux, comparativement à la solution de référence (Ref), tout en divisant par trois la concentration en cryoprotecteur pénétrant (de 1,5M à 0,5M DMSO). Il permet aussi de préserver l'intégrité vasculaire du cortex ovarien, celle-ci étant nécessaire à son utilisation ultérieure dans le cadre d'une greffe.

Cependant les évaluations que nous avons effectuées ont été réalisées très précocément après la décongélation des ovaires et des investigations supplémentaires notamment dans un modèle de greffe hétérotopique d'ovaires de souris sont nécessaires pour confirmer ces résultats encourageants.

Nous vous présenterons dans la partie 3 le modèle de greffe d'ovaire de souris que nous avons mis en place dans le laboratoire afin de poursuivre la validation *in vivo* de l'utilisation du PSH₅₀₀ associé à 0,5M de DMSO et 10% de SVF dans la congélation d'ovaires de souris.

Partie 3 : Modèle de greffe hétérotopique d'ovaires de souris
I. INTRODUCTION

L'évaluation de la survie folliculaire immédiatement post décongélation était une étape nécessaire à l'évaluation du PSH₅₀₀ dans la congélation lente d'ovaire de souris. Elle nous a permis de déterminer qu'il montrait des résultats encourageants comparativement à la solution de référence lorsqu'il était associé à 0,5M de DMSO et 10% de SVF.

Cependant ce type d'évaluation ne permet pas de valider son utilisation dans cette indication sans expérimentation *in vivo*. L'étape suivante nécessaire est la mise en place d'un protocole de greffe d'ovaire chez la souris afin de pouvoir évaluer l'état de l'ovaire congelé puis décongelé après plusieurs jours de greffe. Ce type de protocole permet de se rapprocher de l'utilisation qui est faite du cortex ovarien en pratique clinique chez la femme.

Pour cela il est décrit dans la littérature plusieurs modèles de greffe d'ovaire chez la souris. Youm *et al.* en 2015 a comparé 4 sites de greffe hétérotopique : le muscle dorsal, la graisse, la capsule rénale et la position sous cutanée. La position sous la capsule rénale semblait montrer des résultats supérieurs en terme de follicules intacts, du nombre total d'ovocytes et d'ovocytes matures récupérés après une stimulation comparativement aux 3 autres sites de transplantation¹⁸⁶. Aussi une évaluation du greffon au minimum 7 jours après la greffe semblait recommandée¹⁸⁶. La greffe orthotopique est aussi largement utilisée dans la littérature mais sa mise en place semblait plus complexe^{187,188}.

Nous avons donc choisi la méthode de greffe hétérotopique d'ovaire sous la capsule rénale pour la suite de ce travail.

Cette technique n'étant pas du tout pratiquée au laboratoire LVTS, l'objectif de cette partie était de l'apprendre et de l'importer à partir des protocoles décrits dans la littérature^{168,186,189}, puis de l'évaluer sur plusieurs souris dont les ovaires ont été congelés à l'aide du PSH₅₀₀ associé à 0,5M DMSO + 10% SVF (PSH₅₀₀+DMSO) ou avec la solution de référence (Ref). Un groupe contrôle « Sham » de souris opérées mais ni prélevées, ni greffées, a aussi été mis en place.

Cette partie de mon travail a fait l'objet d'une demande d'autorisation auprès du ministère de l'enseignement et de la recherche et de l'innovation en octobre 2019 et a été accepté en avril 2020 (disponible en Annexe 1). Les résultats présentés sont donc préliminaires.

II. MATERIELS ET METHODES

A. Prélèvement des ovaires de souris en vue de greffe

Des souris femelles âgées de 3 semaines de type B6D2F1 (Janvier Labs, St Berthevin, France), ont été placées en cage (4 maximum) avec nourritures et eau à volonté pour une période de stabulation de 1 semaine. A cette date les souris ont été attribuées à un groupe expérimental : (i) le groupe Sham, où les ovaires de la souris ne sont ni prélevés ni congelés, (ii) le groupe Ref (1,5M DMSO + 10% SVF) ou (iii) le groupe PSH₅₀₀+DMSO (PSH₅₀₀ 40mg/mL + 0,5M DMSO + 10% SVF). Dans ces deux derniers groupes les ovaires ont été prélevés, congelés puis décongelés avant d'être autogreffés en position hétérotopique sous la capsule rénale. Les deux ovaires d'une même souris ont été attribués au même groupe. Enfin 7 jours après la greffe, les ovaires ont été prélevés pour toutes les souris. Un schéma récapitulatif des différentes interventions en fonctions des groupes d'inclusion est présenté Figure 36.



Figure 36 : Schéma récapitulatifs des différentes étapes du protocole de greffe hétérotopique d'ovaire en fonction des groupes d'inclusion.

Afin de prélever les ovaires la souris a été anesthésiée par une injection intrapéritonéale d'un mélange kétamine 100mg/kg et xylazine 10mg/kg. La souris anesthésiée a alors été placée en décubitus ventral et une zone de 3cm x 3cm allant de la tête à la crête iliaque a été rasée puis désinfectée par de la Chlorexidine 0,2% (Figure 37A). Une incision longitudinale à droite de 2cm a été réalisée sur la peau à 1cm latéralement de la ligne médiane suivie une incision du fascia sous-jacent. L'ovaire a été externalisé puis prélevé avec le tissu adipeux avoisinant (Figure 37B). Le fascia et la peau ont ensuite été refermés avec du fil résorbable de 4-0 (Figure 37C). La même opération a été réalisée à gauche. Les souris du groupe Sham, ont été incisées et l'ovaire externalisé et replacé (sans avoir été prélevé) puis le fascia et la peau suturés comme décrit ci-dessus. Après la chirurgie les souris ont reçu une dose de 0,01 mg/kg de buprénorphine afin de limiter la douleur et placées sur une plaque chauffante à 37°C. Elles ont été surveillées jusqu'au réveil complet puis replacées dans leur cage. Chaque souris a été identifiée afin de pouvoir lui réattribuer ses ovaires lors de la phase de greffe.



Figure 37 : Différente étapes de prélèvement d'un ovaire de souris lors du protocole de greffe hétérotopique. (A) rasage et désinfection de la face dorsale et incision de la peau et du fascia, (B) externalisation de l'ovaire (flèche bleue) et prélèvement, (C) suture du fascia et de la peau au fil résorbable 4-0.

L'état de santé des souris a été suivi quotidiennement jusqu'à la greffe selon les deux grilles d'évaluation présentées Figure 38.

Partie 3 : Modèle de greffe hétérotopique d'ovaires de souris

- **D** : sacrifice de l'animal

Etat de la plaie		Changement de poids corporel		Apparence physique		Comportement	
Cicatrisation physiologique	A	Normal	0	Normal	0	Normal	0
Points relachés sans infection	В	Perte de poids < 10%	1	Manque toilettage	1	Activité légèrement	1
Signes legers d'infection :	с					réduite	
Nécrose et infection importante : supuration	D	Perte de poids entre 10 et 20%	3	Poil ébouriffé, écoulements	2	Mobilité réduite, inactivité	2
 A : évolution normale B : désinfection de la plaie 	Perte de poids >20%	5	Poil très ébouriffé, posture anormale	3	Immobilité ou agitation, automutilation	3	
surveillance deux fois par j C : B + injection de buprénorphine en sous-cu	 Score 1 à 2 : surveillance deux fois par jour Score 3 à 4 : injection de buprénorphine en sous-cutané 						

- Score \geq à 5 : sacrifice de l'animal

En cas de persistance des symptômes malgré l'injection de buprénorphine : sacrifice de l'animal

Figure 38 : Grilles d'évaluation permettant le suivi des souris après chirugie.

B. Congélation et décongélation des ovaires de souris

Après leur prélèvement les ovaires ont été placés dans du milieu M2 (Sigma Aldrich Merck, Allemagne) à température ambiante et disséqués sous loupe binoculaire (grossissement x20) comme décrit dans la Partie 2.

La procédure de congélation a été identique à celle décrite dans la Partie 2. Les deux solutions de congélation utilisées ont été la solution de référence « Ref » contenant 1,5M de DMSO et 10% de SVF^{169,172,173} et la solution « PSH₅₀₀+DMSO » contenant l'hydrogel à 40mg/mL + 0,5M DMSO + 10% SVF. La procédure de décongélation était identique à celle de la Partie 2.

Après décongélation les ovaires ont été rincés dans 2 bains de 2 minutes de milieu M2 à température ambiante avant d'être autogreffés (la souris hôte étant la même que la souris donneuse).

C. Greffe des ovaires de souris

Quatre jours après le prélèvement des ovaires la greffe a été réalisée en position hétérotopique ou niveau de la capsule rénale. Pour cela la souris a été anesthésiée par une injection intrapéritonéale d'un mélange kétamine 100mg/kg et xylazine 10mg/kg. Elle a été placée en décubitus ventral. Les points réalisés lors du prélèvement des ovaires ont été coupés du côté droit. Le rein a ensuite été externalisé (Figure 39A). Une aiguille sous cutanée a été placée sous la capsule rénale et du sérum physiologique injecté afin de décoller celle-ci (Figure 39B). L'ovaire décongelé a été placé sous la capsule (Figure 39C). Le fascia et la peau ont ensuite été suturés avec du fil résorbable 4-0. La même opération a été réalisée du côté gauche. Les souris du groupe Sham ont été incisées et le rein externalisé et replacé puis le fascia et la peau suturés comme décrit ci-dessus. Après la chirurgie les souris ont reçu une dose de 0,01 mg/kg de buprénorphine afin de limiter la douleur et placées sur une plaque chauffante à 37°C. Elles ont été surveillées jusqu'au réveil complet puis replacées dans leur cage.



Figure 39 : Différente étapes de prélèvement d'un ovaire de souris lors du protocole de greffe hétérotopique. (A) externalisation du rein, (B) décollement de la capsule avec du sérum physiologique, (C) replacement de l'ovaire sous la capsule rénale.

L'état de santé des souris a là aussi été suivi quotidiennement jusqu'à leur sacrifice (Figure 38).

D. Prélèvement des ovaires de souris après greffe.

Le prélèvement des ovaires a été réalisé au 7^{ème} jour post greffe. Les souris ont alors été anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'un mélange kétamine 100mg/kg et xylazine 10mg/kg et sacrifiées par dislocation cervicale. Les souris ont été placées en décubitus ventral. L'abdomen a été désinfecté à la Chlorhexidine 0,2% puis une incision médiane en Y a été pratiquée. Pour les souris greffées (groupes Ref et PSH₅₀₀+DMSO), les reins avec les ovaires greffés ont été prélevés. Une analyse macroscopique de l'état du rein et du greffon a alors été réalisée.

Pour les souris du groupe Sham, après repérage de l'utérus pour situer les ovaires rapidement, ceux-ci ont été prélevés avec le tissu adipeux périphérique ainsi qu'une section de l'oviducte afin de préserver l'intégrité de l'organe. Le prélèvement a alors été disséqué sous loupe afin d'isoler l'ovaire comme décrit dans la Partie 2.

Pour les souris greffées le rein entier a été prélevé puis une coupe a été effecutée au scalpel sur la section transversale de l'ovaire juste sous la greffe (Figure 40).



Figure 40 : Schéma de section de l'ovaire greffé avant fixation et inclusion en paraffine.

E. Classification des follicules et analyse morphologique

Les échantillons ont été fixés et inclus en paraffine comme décrit dans la Partie 2. Les reins greffés ont été inclus la section vers le haut afin de faciliter la découpe histologique.

La classification et l'analyse des follicules après coloration par hématoxyline/éosine a été réalisée comme décrit dans la partie 2.

III. RESULTATS

Dix souris ont été inclues dans le protocole de greffe hétérotopique d'ovaires. Trois souris ont été inclues dans le groupe Ref (numérotées de 1 à 3) et 4 dans le groupe PSH₅₀₀+DMSO (numérotés de 4 à 7) et 3 dans le groupe Sham (numérotée de 8 à 10). La souris 6 est décédée lors de la phase de greffe hétérotopique. Les autres souris n'ont présenté aucune altération de leur état de santé après les différentes chirurgies avec une perte de poids de 2g maximum. Les sutures sont restées saines jusqu'au prélèvement final des ovaires.

A. Aspect macroscopique des ovaires après à 7 jours post greffe

L'aspect macroscopique des ovaires après 7 jours de greffe est présenté Figure 41. Pour aucune des souris nous n'avons noté un aspect nécrotique ou inflammatoire de l'ovaire greffé ou du rein et une absence d'adhérence autour du site opératoire. L'aspect des ovaires était identique pour toutes les souris qu'elles soient du groupe Ref (souris 1, 2 et 3) ou PSH₅₀₀+DMSO (souris 4, 5 et 7).



Figure 41 : Aspect macroscopique des ovaires à 7 jours post-greffe. Les cercles bleus entourent les ovaires. Ref : DMSO 1,5M + 10% SVF, PSH500+DMSO : PSH500 40mg/mL + 0,5M DMSO + 10% SVF.

B. Classification des follicules et anaylse histologique

Concernant les souris du groupe Sham, la proportion de follicules intacts était de 88,9% et de 86,6% pour les follicules primordiaux. La répartition par type folliculaire était la suivante 71,3% de follicules primordiaux, 16,2% de follicules primaires, 6,6% de follicules secondaires et 5,9% de follicules tertiaires.

Contrairement au groupe Ref, des zones saines avec des follicules primordiaux et primaires intacts ont été retrouvés pour les souris du groupe PSH_{500} +DMSO. Sur les sections histologiques dont nous avons disposé, ces zones étaient trop rares pour effectuer un comptage folliculaire objectif. La Figure 42 présente des follicules primaires et primordiaux observés sur les ovaires à 7 jours post greffe. On observe aussi des zones vascularisées avec la présence de globule rouges dans le groupe PSH₅₀₀+DMSO.



Figure 42 : Coloration hématoxyline éosine d'ovaires de souris des groupes Sham, Ref et PSH₅₀₀+DMSO. Les barres d'échelle représentent 50μm. Les flèches bleues indiquent des follicules primordiaux, la flèche verte un follicule primaire et les flèches rouges des zones vascularisées avec la présence de globules rouges intraluminaux.

IV. DISCUSSION

Nous avons pour cette partie mis en place un modèle de greffe hétérotopique d'ovaires de souris. Il a permis de greffer des ovaires congelés et décongelés avec la solution Ref contenant 1,5M de DMSO et 10% de SVF et la solution PSH₅₀₀+DMSO contenant le PSH₅₀₀ à 40mg/mL + 0,5M de DMSO + 10% de SVF. Cette technique n'avait encore jamais été réalisée dans le laboratoire. Après une première analyse histologique des ovaires congelés/décongelés puis greffés nous avons pu mettre en évidence des zones présentant des follicules primordiaux et primaires intacts 7 jours après la greffe.

Les sections contenant des follicules étaient cependant rares et cela ne nous a pas permis de réaliser une analyse quantitative objective. Il y a plusieurs hypothèses pouvant expliquer cet écueil. Tout d'abord cela peut être lié à la congélation en elle-même. En effet nous avons déjà vu que les dommages causés par la congélation peuvent apparaitre jusqu'à 24 heures après la décongélation^{169,172}. Le fait de retrouver seulement de rares zones contenant des follicules intacts sur les ovaires greffés peut être dû à ce phénomène. Cependant la structure bien conservée des follicules qui ont pu être observés semble démontrer une viabilité des tissus congelés/décongelés à 7 jours post greffe. L'aspect macroscopique ne présentant pas de zones nécrotiques est aussi en faveur de cette éventualité. La seconde hypothèse est liée à la technique de greffe en elle-même. En effet celle-ci a été réalisée pour la première fois dans le laboratoire LVTS, nous étions donc débutants dans le domaine pour une technique qui semble maitrisée par seulement quelques équipes. Ceci pourrait expliquer nos résultats sur cette première série de greffes. Afin de confirmer l'une ou l'autre de ces deux hypothèses nous allons réaliser sur un prochain groupe de souris des greffes d'ovaires non congelés (frais) en sus des souris Sham qui ne sont pas greffées. Cela nous permettrait d'évaluer si l'aspect obtenu à 7 jours post-greffe est lié à la technique de greffe ou de congélation. Enfin la dernière hypothèse est liée au traitement histologique en lui-même. Tout d'abord nous avons observé que les follicules primordiaux n'étaient pas répartis de façon homogène sur les ovaires non greffés, ceux-ci présentaient des zones importantes sans aucun follicule puis des zones denses avec des follicules très proches. Pour un ovaire entier il est plus simple d'obtenir des coupes sur une grande surface de l'ovaire celui-ci étant facilement identifiable et orientable dans le bloc d'inclusion. De plus durant la découpe au microtome il est simple d'évaluer le niveau de la section afin de réaliser des coupes au niveau le plus large de l'ovaire. Faire une coupe au niveau des zones contenant les follicules primordiaux est donc plus facilement réalisable. Pour un ovaire greffé, celui-ci est « lié » au rein, il est plus compliqué de situer le niveau de la section lors de la découpe au microtome pour

obtenir une coupe de l'ovaire suffisamment large afin de pouvoir observer des follicules primordiaux. Il semble que cet écueil ait été rencontré aussi dans la littérature notamment par Zhang *et al.* 2011 qui présentent des densités folliculaires très faibles au niveau des ovaires greffés de 1,31±0,21/mm³ pour des ovaires frais non congelés et entre 0,65±0,09/mm³ et 0,94±0,23/mm³ pour des ovaires congelés¹⁹⁰. Afin de contourner ce problème on pourrait envisager d'explanter l'ovaire greffé afin de faciliter son traitement histologique et d'obtenir de larges coupes plus simplement.

V. CONCLUSION

Ce modèle de greffe hétérotopique d'ovaire de souris nous a permis de mettre en évidence la présence de follicules primordiaux et primaires intacts après 7 jours de greffe sur des ovaires congelés avec le PSH₅₀₀ à 40mg/mL, 0,5M de DMSO et 10% de SVF. Cependant il n'a pas été possible de réaliser une analyse quantitative objective du pourcentage de follicules intacts en fonction des stades de développement.

Il existe cependant plusieurs pistes pour améliorer ce modèle. Tout d'abord il est nécessaire de déterminer le rôle de la greffe ou de la congélation sur le faible nombre de follicules que nous avons observés en réalisant des greffes d'ovaires non congelés. De plus il est nécessaire d'optimiser le traitement histologique des échantillons peut-être en réalisant une explantation des ovaires avant leur traitement histologique pour obtenir des sections assez larges pour pouvoir y observer plus facilement des follicules primordiaux.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de notre travail était de synthétiser un hydrogel à base de dextrane de grade pharmaceutique réticulé avec du STMP, d'évaluer ses caractéristiques physico-chimiques et d'expérimenter son utilisation dans la congélation lente d'ovaires de souris.

La première partie de notre travail nous a permis d'établir les caractéristiques physicochimiques de ces PSHs, de confirmer leur biocompatiblité et leur absence de cytotoxicité. Nous avons aussi montré que le PSH₅₀₀ utilisé seul à une concentration de 40mg/mL permettait de congeler des cellules BALB/c 3T3 sans DMSO avec une viabilité post décongélation similaire à celle obtenue avec 10% de DMSO sans hydrogel. La seconde partie de notre travail a été consacrée à la synthèse d'un lot de PSH₅₀₀ et à la mise en application de celui-ci dans la congélation d'ovaires de souris en le comparant à la solution de référence utilisant du DMSO à 1,5M et 10% de SVF. Appliqué à la congélation d'ovares murins, le PSH₅₀₀ associé à 0,5M de DMSO et 10% de SVF (solution PSH₅₀₀₊DMSO) montrait des résultats comparables à la solution de référence (Ref) utilisant 3 fois plus de DMSO (1,5M DMSO et 10% SVF). Enfin, nous avons mis en place un modèle de geffe hétérotopique d'ovaire de souris. L'analyse histologique des ovaires greffés, bien que partielle, a pu mettre en évidence des zones avec des follicules primordiaux et primaires intacts après congélation/décongélation avec la solution PSH₅₀₀₊DMSO.

Le PSH₅₀₀ semble être un dispositif non cytotoxique prometteur dans le cadre d'une utilisation sans DMSO pour la congélation de cellules ou de tissus notamment la congélation de cortex ovarien en divisant par trois la concentration en DMSO. Cependant plusieurs éléments restent à déterminer à la suite de ce travail.

Tout d'abord le mécanisme de cryoprotection de l'hydrogel n'est pas complètement élucidé. Il semble aussi que son rôle ne soit pas le même lors la congélation de cellules ou de tissus de par la configuration de l'échantillon à congeler et de sa taille. Tout d'abord, pour la congélation de cellules les particules d'hydrogel peuvent s'intercaler entre les cellules et être en contact direct avec l'ensemble de celles-ci (Figure 43A). Pour un tissu les grains d'hydrogel ne peuvent se mettre qu'en périphérie du tissu (Figure 43B) et non au contact de chaque cellule. Son éventuel rôle de protection des membranes par « l'extérieur » est alors très limité¹¹⁶.



Figure 43 : Schéma d'intéraction de l'hydrogel avec cellules (B) et un tissu (B). En rose un tissu, en violet des cellules en suspension, en gris les particules de PSH₅₀₀.

Aussi, plusieurs hypothèses peuvent être émises quant aux mécanismes de cryoprotection du PSH₅₀₀ en absence de DMSO pour les cellules en ou en sa présence pour les tissus. Ces mécanismes sont vraisemblablement liés à ses caractéristiques comme son taux de réticulation, sa granulométrie, le polysaccharide dont il est composé et la façon dont il est chargé électriquement. Les différentes hypothèses mécanistiques de cryoprotection du PSH₅₀₀ sont illustrées dans la Figure 44.



Caractéristiques



Figure 44 : Schéma récapitulatif des différentes hypothèses des mécanismes de cryoprotection du PSH₅₀₀. a : mécanisme propre à la congélation en présence de DMSO, b : mécanisme propre à la congélation de cellules.

Il existe différentes pistes afin d'explorer ces mécanismes. La cryomicroscopie est l'une d'entre elles, elle permet d'observer la formation des cristaux de glace et la déshydratation cellulaire lors d'une descente en température contrôlée^{54,156} et pourrait illustrer le rôle du PSH₅₀₀ dans la congélation de cellules ou de tissus en présence ou non de DMSO. Il pourrait nous permettre de déterminer avec une grande précision la température d'apparition des cristaux de glace et la cinétique de déshydratation cellulaire et ainsi d'adapter de manière très fine le protocole de descente en température contrôlée et la température du seeding dans l'objectif d'améliorer nos résultats.

Concernant le seeding, une étude a été réalisée par Louis Hatte dans notre laboratoire sur l'observation avec une caméra thermique A325sc[®] (Filr, Etats-Unis) de paillettes de congélation

Conclusion générale

(Cryobiosystem, France) contenant ou non le PSH_{500} et soumis à une descente en température contrôlé (-2°C/min). Il a pu mettre en évidence que la cristallisation s'effectuait d'abord dans les paillettes contenant le PSH_{500} , allant dans le sens de l'hypothèse d'une induction du seeding par les particules d'hydrogel et cela en absence de choc thermique.

Enfin, il est également possible de modifier notre hydrogel dans l'objectif d'améliorer sa capacité cryoprotectrice en modifiant par exemple son taux de réticulation pour influer sur sa capacité à retenir le milieu environnant, ou alors sa granulométrie qui pourrait modifier la température du seeding ou la façon dont il entoure les cellules ou le tissu.

Concernant la congélation de cortex ovarien avec le PSH₅₀₀ les expérimentations que nous avons conduites ne sont qu'une première étape avant une potentielle utilisation du PSH₅₀₀ en clinique dans cette indication. Il faudra dans un premier temps poursuivre l'expérimentation animale et ajuster le modèle de greffe et les modalités de traitement histologique des échantillons greffés afin de confirmer ces résultats. Une fois ceci effectué, il faudra mener à son terme le projet accepté cette année par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation qui doit inclure 60 souris avec évaluation d'ovaires congelés/décongelés à 7 jours et 21 jours après greffe. Les analyses histologiques seront complétées par des dosages sanguins de l'hormone folliculo-stimulante¹⁶⁸.

Un modèle de greffe orthotopique permettrait aussi de confirmer la préservation de la fonction reproductrice de l'ovaire en induisant des grossesses et des naissances vivantes sur les souris greffées avec¹⁸⁸ ou sans procédure de fécondation *in vitro*¹⁸⁷. Une alternative à la greffe pourrait être la mise en place d'une culture folliculaire *in vitro* suivie d'une mise en fécondation des ovocytes matures obtenus¹⁶⁹.

Il pourra ensuite être envisagé d'utiliser la solution PSH₅₀₀+DMSO pour la congélation de cortex ovarien humain dans le cadre d'un protocole hospitalier de recherche clinique (PHRC), d'abord sur des fragments de cortex d'ovaires pathologiques recueillis par exemple lors de résections de kystes, puis sur une partie de fragments congelés dans le cadre de la préservation de la fertilité.

En conclusion, le PSH₅₀₀ peut être considéré comme un dispositif médical de classe IIa selon la réglementation UE 217/745 car il répond à la règle 2 précisant que « tous les dispositifs non invasifs destinés à canaliser ou à stocker du sang, des liquides corporels ou de tissus, de liquides ou de gaz en vue d'une éventuelle perfusion, administration ou l'introduction dans le corps sont de classe IIa ». Les expérimentations *in vivo* et *in vitro* déjà menées et futures, tout comme la caractérisation du PSH₅₀₀, sa biocompatibilité et la compréhension de son mécanisme d'action sont nécessaires afin d'obtenir

117

une autorisation de mise sur le marché comme dispositif médical de Classe IIa et un marquage CE auprès de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) pour une utilisation en clinique. Les différents éléments à fournir pour fournir cette autorisation sont présentés dans la Figure 45.



Figure 45 : Eléments nécessaires à l'obtention du marquage CE pour un dispositif médical (DM) de classe IIa. * : désigne les étapes déjà réalisées, # : désigne les étapes en cours. AMM : autorisation de mise sur le marché, ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. PHRC : protocole hospitalier de recherche clinique, prélim. : préliminaire

Références bibliographiques

- Autissier, A., Letourneur, D. & Le Visage, C. Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. J. Biomed. Mater. Res. A 82, 336–342 (2007).
- Chaouat, M., Le Visage, C., Autissier, A., Chaubet, F. & Letourneur, D. The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats. *Biomaterials* 27, 5546–5553 (2006).
- 3. Meddahi-Pellé, A., Abed, A., Letourneur, D. & Baudot, A. Cryopreservation of cells, tissues and organs. (2013).
- 4. LOI n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique (1) Légifrance. https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000024323102/.
- 5. Cobo, A. *et al.* Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil. Steril.* **105**, 755-764.e8 (2016).
- 6. Grynberg, M. *et al.* [In vitro maturation of oocytes: an option for fertility preservation in women]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* **40**, 103–108 (2011).
- Sonmezer, M. & Oktay, K. Fertility preservation in female patients. *Hum. Reprod. Update* 10, 251–266 (2004).
- Harada, M. & Osuga, Y. Fertility preservation for female cancer patients. *Int. J. Clin. Oncol.* 24, 28–33 (2019).
- Agence de la biomédecine. https://rams.agence-biomedecine.fr/preservation-de-la-fertilite 0.
- 10. Masson, E. Physiologie ovarienne. *EM-Consulte* https://www.emconsulte.com/article/977524/physiologie-ovarienne.
- 11. Brennan, J. & Capel, B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 509–521 (2004).
- Phillips, S. M. *et al.* Survivors of Childhood Cancer in the United States: Prevalence and Burden of Morbidity. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 24, 653–663 (2015).
- Long, C. J., Ginsberg, J. P. & Kolon, T. F. Fertility Preservation in Children and Adolescents With Cancer. *Urology* 91, 190–196 (2016).
- Les cancers en France en 2018 L'essentiel des faits et chiffres (édition 2019) Ref : ETKAFR19. https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Lescancers-en-France-en-2018-L-essentiel-des-faits-et-chiffres-edition-2019.
- von Wolff, M. *et al.* Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy – A technique in its infancy but already successful in fertility preservation. *Eur. J. Cancer* **45**, 1547–1553 (2009).
- 16. Donnez, J. *et al.* Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in cancer patients. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **24**, 87–100 (2010).

- 17. ESHRE Guideline Female fertility preservation. https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/Guidelines/Female-fertility-preservation.
- 18. Gellert, S. E. *et al.* Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue: an update on worldwide activity published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort. *J. Assist. Reprod. Genet.* **35**, 561–570 (2018).
- Paradisi, R. *et al.* New insights in the selection and management of cancer patients applicants for ovarian tissue cryopreservation. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 32, 881–885 (2016).
- Howell, S. & Shalet, S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 27, 927–943 (1998).
- 21. Thomson, A. B. *et al.* Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: a case-control study. *The Lancet* **360**, 361–367 (2002).
- Chaput, L. *et al.* Préservation de la fertilité en cancérologie. *Bull. Cancer (Paris)* 105, 99–110 (2018).
- 23. Wallace, W. H. B., Anderson, R. A. & Irvine, D. S. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol.* **6**, 209–218 (2005).
- 24. Poirot, C. et al. Fertilité et cancer. Presse Médicale 42, 1513–1520 (2013).
- 25. Poirot, C. *et al.* Impact of cancer chemotherapy before ovarian cortex cryopreservation on ovarian tissue transplantation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **34**, 1083–1094 (2019).
- Donnez, J. & Dolmans, M.-M. Fertility Preservation in Women. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1614676 https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1614676 (2017) doi:10.1056/NEJMra1614676.
- Rivas Leonel, E. C., Lucci, C. M. & Amorim, C. A. Cryopreservation of Human Ovarian Tissue: A Review. *Transfus. Med. Hemotherapy* 46, 173–181 (2019).
- Fortin, A. *et al.* Comment je fais ... une greffe orthotopique de cortex ovarien par voie cœlioscopique. *Gynécologie Obstétrique Fertil. Sénologie* 47, 317–320 (2019).
- Poirot, C. *et al.* Induction of puberty by autograft of cryopreserved ovarian tissue. *The Lancet* 379, 588 (2012).
- 30. Oktay, K. & Oktem, O. Ovarian cryopreservation and transplantation for fertility preservation for medical indications: report of an ongoing experience. *Fertil. Steril.* **93**, 762–768 (2010).
- 31. Jensen, A. K. *et al.* 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *J. Assist. Reprod. Genet.* **34**, 325–336 (2017).
- 32. Oktay, K., Bedoschi, G., Pacheco, F., Turan, V. & Emirdar, V. First pregnancies, live birth, and in vitro fertilization outcomes after transplantation of frozen-banked ovarian tissue with a human

extracellular matrix scaffold using robot-assisted minimally invasive surgery. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **214**, 94.e1-94.e9 (2016).

- 33. Meirow, D. *et al.* Transplantations of frozen-thawed ovarian tissue demonstrate high reproductive performance and the need to revise restrictive criteria. *Fertil. Steril.* **106**, 467–474 (2016).
- Rodriguez-Wallberg, K. A. *et al.* Ovarian tissue cryopreservation and transplantation among alternatives for fertility preservation in the Nordic countries – compilation of 20 years of multicenter experience. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **95**, 1015–1026 (2016).
- 35. Donnez, J. *et al.* Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *The Lancet* **364**, 1405–1410 (2004).
- 36. Bockstaele, L., Tsepelidis, S., Dechene, J., Englert, Y. & Demeestere, I. Safety of Ovarian Tissue Autotransplantation for Cancer Patients. *Obstet. Gynecol. Int.* **2012**, (2012).
- 37. Sadri-Ardekani, H. *et al.* Eliminating acute lymphoblastic leukemia cells from human testicular cell cultures: a pilot study. *Fertil. Steril.* **101**, 1072-1078.e1 (2014).
- 38. Grèze, V. *et al.* Highly sensitive assessment of neuroblastoma minimal residual disease in ovarian tissue using RT-qPCR—A strategy for improving the safety of fertility restoration. *Pediatr. Blood Cancer* **64**, e26287 (2017).
- 39. Rienzi, L. *et al.* Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **25**, 66–73 (2010).
- 40. Fadini, R. *et al.* Human oocyte cryopreservation: comparison between slow and ultrarapid methods. *Reprod. Biomed. Online* **19**, 171–180 (2009).
- 41. Rienzi, L. *et al.* Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum. Reprod. Update* **23**, 139–155 (2017).
- 42. Fuller, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters* **25**, 375–388 (2004).
- 43. Gurruchaga, H. *et al.* Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells. *J. Controlled Release* **281**, 119–138 (2018).
- 44. Lovelock, J. E. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem. J.* **56**, 265–270 (1954).
- 45. Meryman, H. T. Modified Model for the Mechanism of Freezing Injury in Erythrocytes. *Nature* 218, 333–336 (1968).
- 46. Polge, C., Smith, A. U. & Parkes, A. S. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature* **164**, 666–666 (1949).

- 47. Berthelot-Ricou, A. *et al.* Assessment of 1,2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay. *Fertil. Steril. 96*, 1002–1007 (2011).
- 48. Aye, M. *et al.* Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: Dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food Chem. Toxicol.*48, 1905–1912 (2010).
- 49. McClean, R., Holt, W. V., Zee, Y. P., Lisle, A. & Johnston, S. D. The effect of cryoprotectant on kangaroo sperm ultrastructure and mitochondrial function. *Cryobiology* **57**, 297–303 (2008).
- 50. Zenhäusern, R., Tobler, A., Leoncini, L., Hess, O. M. & Ferrari, P. Fatal cardiac arrhythmia after infusion of dimethyl sulfoxide-cryopreserved hematopoietic stem cells in a patient with severe primary cardiac amyloidosis and end-stage renal failure. *Ann. Hematol.* **79**, 523–526 (2000).
- 51. Benekli, M. *et al.* Severe respiratory depression after dimethylsulphoxide-containing autologous stem cell infusion in a patient with AL amyloidosis. *Bone Marrow Transplant.* **25**, 1299–1301 (2000).
- 52. Zhang, M., Oldenhof, H., Sieme, H. & Wolkers, W. F. Freezing-induced uptake of trehalose into mammalian cells facilitates cryopreservation. *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* **1858**, 1400–1409 (2016).
- 53. Meryman, H. T. Mechanics of Freezing in Living Cells and Tissues. *Science* **124**, 515–521 (1956).
- 54. Leibo, S. P., McGrath, J. J. & Cravalho, E. G. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology* **15**, 257–271 (1978).
- 55. Mazur, P., Leibo, S. P. & Chu, E. H. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury: Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp. Cell Res.* **71**, 345–355 (1972).
- 56. Mazur, P. Cryobiology: The Freezing of Biological Systems. *Science* **168**, 939–949 (1970).
- 57. John Morris, G. & Acton, E. Controlled ice nucleation in cryopreservation A review. *Cryobiology* **66**, 85–92 (2013).
- Karlsson, J. O. & Toner, M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. Biomaterials 17, 243–256 (1996).
- 59. Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angell, C. A. & Meryman, H. T. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* **21**, 407–426 (1984).
- 60. Rall, W. F. & Fahy, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* **313**, 573–575 (1985).
- Chen, S.-U. & Yang, Y.-S. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 48, 15–22 (2009).

- 62. Sanfilippo, S. *et al.* Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* **13**, (2015).
- 63. Revelli, A. *et al.* Live birth after orthotopic grafting of autologous cryopreserved ovarian tissue and spontaneous conception in Italy. *Fertil. Steril.* **99**, 227–230 (2013).
- 64. Gook, D. A., Edgar, D. H., Borg, J., Archer, J. & McBain, J. C. Diagnostic assessment of the developmental potential of human cryopreserved ovarian tissue from multiple patients using xenografting. *Hum. Reprod.* **20**, 72–78 (2005).
- Silber, S. J. *et al.* Ovarian Transplantation between Monozygotic Twins Discordant for Premature Ovarian Failure. *http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa043157* https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa043157 (2009) doi:10.1056/NEJMoa043157.
- 66. Kagawa, N., Silber, S. & Kuwayama, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online* **18**, 568–577 (2009).
- 67. Wang, Y., Xiao, Z., Li, L., Fan, W. & Li, S.-W. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **23**, 2256–2265 (2008).
- 68. Suzuki, N. *et al.* Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Hum. Reprod.* **30**, 608–615 (2015).
- 69. Amorim, C. A., Curaba, M., Van Langendonckt, A., Dolmans, M.-M. & Donnez, J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online* **23**, 160–186 (2011).
- 70. Gandolfi, F. *et al.* Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil. Steril.* **85**, 1150–1156 (2006).
- 71. Isachenko, V. *et al.* Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. *Reproduction* **138**, 319–327 (2009).
- 72. Oktem, O. *et al.* Vitrified human ovaries have fewer primordial follicles and produce less antimüllerian hormone than slow-frozen ovaries. *Fertil. Steril.* **95**, 2661-2664.e1 (2011).
- Amorim, C. A., David, A., Van Langendonckt, A., Dolmans, M.-M. & Donnez, J. Vitrification of human ovarian tissue: effect of different solutions and procedures. *Fertil. Steril.* **95**, 1094–1097 (2011).
- 74. Fabbri, R. *et al.* Good Preservation of Stromal Cells and No Apoptosis in Human Ovarian Tissue after Vitrification. *BioMed Res. Int.* **2014**, (2014).
- 75. Shi, Q., Xie, Y., Wang, Y. & Li, S. Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-anlaysis. *Sci. Rep.* **7**, (2017).

- 76. Zhou, X.-H., Zhang, D., Shi, J. & Wu, Y.-J. Comparison of vitrification and conventional slow freezing for cryopreservation of ovarian tissue with respect to the number of intact primordial follicles. *Medicine (Baltimore)* **95**, (2016).
- 77. Herraiz, S. *et al.* Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertil. Steril.* **101**, 775–784 (2014).
- 78. Keros, V. *et al.* Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **24**, 1670–1683 (2009).
- 79. Fabbri, R. *et al.* Morphological, ultrastructural and functional imaging of frozen/thawed and vitrified/warmed human ovarian tissue retrieved from oncological patients. *Hum. Reprod.* **31**, 1838–1849 (2016).
- Xiao, Z., Wang, Y., Li, L.-L. & Li, S. In vitro culture thawed human ovarian tissue: NIV versus slow freezing method. *Cryo Letters* 34, 520–526 (2013).
- Huang, L. *et al.* Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **139**, 193–198 (2008).
- Klocke, S., Bündgen, N., Köster, F., Eichenlaub-Ritter, U. & Griesinger, G. Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Arch. Gynecol. Obstet.* 291, 419–426 (2015).
- Xiao, Z., Wang, Y., Li, L., Luo, S. & Li, S.-W. Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. *Fertil. Steril.* 94, 2323–2328 (2010).
- 84. Poirot, C. *et al.* Human ovarian tissue cryopreservation: indications and feasibility. *Hum. Reprod.* **17**, 1447–1452 (2002).
- 85. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. & Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 27–46 (2000).
- 86. Wechsler, M. E. *et al.* Engineered microscale hydrogels for drug delivery, cell therapy, and sequencing. *Biomed. Microdevices* **21**, 31 (2019).
- 87. Canal, T. & Peppas, N. A. Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks. *J. Biomed. Mater. Res.* **23**, 1183–1193 (1989).
- Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A. & Langer, R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Adv. Mater.* 18, 1345–1360 (2006).
- Characterisation and Design of Tissue Scaffolds 1st Edition. https://www.elsevier.com/books/characterisation-and-design-of-tissue-scaffolds/tomlins/978-1-78242-087-3.

- 90. Varaprasad, K., Raghavendra, G. M., Jayaramudu, T., Yallapu, M. M. & Sadiku, R. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Mater. Sci. Eng. C* **79**, 958–971 (2017).
- 91. Thorén, L. The dextrans--clinical data. *Dev. Biol. Stand.* 48, 157–167 (1980).
- 92. Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A. & Peppas, N. A. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* **21**, 3307–3329 (2009).
- 93. Hassan, C. M. & Peppas, N. A. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. in *Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites* 37–65 (Springer, 2000). doi:10.1007/3-540-46414-X_2.
- 94. Tsuji, H. *et al.* Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactic acid)s. 7. Phase structure of the stereocomplex crystallized from a dilute acetonitrile solution as studied by high-resolution solid-state carbon-13 NMR spectroscopy. *Macromolecules* **25**, 4114–4118 (1992).
- Zhao, G., Liu, X., Zhu, K. & He, X. Hydrogel Encapsulation Facilitates Rapid-Cooling Cryopreservation of Stem Cell-Laden Core–Shell Microcapsules as Cell–Biomaterial Constructs. *Adv. Healthc. Mater.* 6, 1700988 (2017).
- Okay, O. Self-Healing Hydrogels Formed via Hydrophobic Interactions. in *Supramolecular Polymer Networks and Gels* (ed. Seiffert, S.) 101–142 (Springer International Publishing, 2015). doi:10.1007/978-3-319-15404-6_3.
- 97. Ye, X. *et al.* Self-healing pH-sensitive cytosine- and guanosine-modified hyaluronic acid hydrogels via hydrogen bonding. *Polymer* **108**, 348–360 (2017).
- 98. Abed, A. *et al.* Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. A* **96A**, 535–542 (2011).
- 99. Abaee, A., Madadlou, A. & Saboury, A. A. The formation of non-heat-treated whey protein cold-set hydrogels via non-toxic chemical cross-linking. *Food Hydrocoll.* **63**, 43–49 (2017).
- 100. Essawy, H. A., Ghazy, M. B. M., El-Hai, F. A. & Mohamed, M. F. Superabsorbent hydrogels via graft polymerization of acrylic acid from chitosan-cellulose hybrid and their potential in controlled release of soil nutrients. *Int. J. Biol. Macromol.* **89**, 144–151 (2016).
- Sadat Ebrahimi, M.-M., Voss, Y. & Schönherr, H. Rapid Detection of Escherichia coli via Enzymatically Triggered Reactions in Self-Reporting Chitosan Hydrogels. ACS Appl. Mater. Interfaces 7, 20190–20199 (2015).
- Miladinovic, Z. R., Micic, M. & Suljovrujic, E. Temperature/pH dual responsive OPGMA based copolymeric hydrogels prepared by gamma radiation: an optimisation study. *J. Polym. Res.* 23, 77 (2016).

- 103. Mane, S., Ponrathnam, S. & Chavan, N. Effect of Chemical Cross-linking on Properties of Polymer Microbeads: A Review. in (2016). doi:10.13179/canchemtrans.2015.03.04.0245.
- 104. Zhu, J. & Marchant, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev. Med. Devices* **8**, 607–626 (2011).
- Bejenariu, A., Popa, M., Dulong, V., Picton, L. & Le Cerf, D. Trisodium trimetaphosphate crosslinked xanthan networks: synthesis, swelling, loading and releasing behaviour. *Polym. Bull.* 62, 525–538 (2009).
- 106. Naahidi, S. *et al.* Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnol. Adv.* **35**, 530–544 (2017).
- 107. Norouzi, M., Nazari, B. & Miller, D. W. Injectable hydrogel-based drug delivery systems for local cancer therapy. *Drug Discov. Today* **21**, 1835–1849 (2016).
- 108. Gao, W., Zhang, Y., Zhang, Q. & Zhang, L. Nanoparticle-Hydrogel: A Hybrid Biomaterial System for Localized Drug Delivery. *Ann. Biomed. Eng.* **44**, 2049–2061 (2016).
- 109. Narayanaswamy, R. & Torchilin, V. P. Hydrogels and Their Applications in Targeted Drug Delivery. *Molecules* **24**, (2019).
- 110. Cooper, R. C. & Yang, H. Hydrogel-based ocular drug delivery systems: Emerging fabrication strategies, applications, and bench-to-bedside manufacturing considerations. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **306**, 29–39 (2019).
- 111. Wang, X. & Xu, H. Incorporation of DMSO and dextran-40 into a gelatin/alginate hydrogel for controlled assembled cell cryopreservation. *Cryobiology* **61**, 345–351 (2010).
- 112. Quan, G. B., Han, Y., Liu, M. X. & Gao, F. Effects of pre-freeze incubation of human red blood cells with various sugars on postthaw recovery when using a dextran-rapid cooling protocol. *Cryobiology* **59**, 258–267 (2009).
- 113. Halberstadt, M., Athmann, S. & Hagenah, M. Corneal cryopreservation with dextran. *Cryobiology* **43**, 71–80 (2001).
- 114. Rajan, R., Jain, M. & Matsumura, K. Cryoprotective properties of completely synthetic polyampholytes via reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization and the effects of hydrophobicity. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **24**, 1767–1780 (2013).
- 115. Matsumura, K. & Hyon, S.-H. Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties. *Biomaterials* **30**, 4842–4849 (2009).
- 116. Jain, M., Rajan, R., Hyon, S.-H. & Matsumura, K. Hydrogelation of dextran-based polyampholytes with cryoprotective properties via click chemistry. *Biomater. Sci.* **2**, 308–317 (2014).
- 117. Huang, H. *et al.* Alginate Hydrogel Microencapsulation Inhibits Devitrification and Enables Large-Volume Low-CPA Cell Vitrification. *Adv. Funct. Mater.* **25**, 6839–6850 (2015).

- 118. Serra, M. *et al.* Microencapsulation Technology: A Powerful Tool for Integrating Expansion and Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* **6**, (2011).
- 119. Mumaw, J. *et al.* Rapid Heterotrophic Ossification with Cryopreserved Poly(ethylene glycol-) Microencapsulated BMP2-Expressing MSCs. *Int. J. Biomater.* **2012**, (2012).
- 120. Chen, B., Wright, B., Sahoo, R. & Connon, C. J. A novel alternative to cryopreservation for the short-term storage of stem cells for use in cell therapy using alginate encapsulation. *Tissue Eng. Part C Methods* **19**, 568–576 (2013).
- 121. Perteghella, S. *et al.* Alginate encapsulation preserves the quality and fertilizing ability of Mediterranean Italian water buffalo (Bubalus bubalis) and Holstein Friesian (Bos taurus) spermatozoa after cryopreservation. *J. Vet. Sci.* **18**, 81–88 (2017).
- 122. Liu, X., Zhao, G., Chen, Z., Panhwar, F. & He, X. Dual Suppression Effect of Magnetic Induction Heating and Microencapsulation on Ice Crystallization Enables Low-Cryoprotectant Vitrification of Stem Cell–Alginate Hydrogel Constructs. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 16822–16835 (2018).
- 123. Zeng, J. *et al.* A Supramolecular Gel Approach to Minimize the Neural Cell Damage during Cryopreservation Process. *Macromol. Biosci.* **16**, 363–370 (2016).
- 124. Dulong, V. *et al.* Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization. *Carbohydr. Polym.* **57**, 1–6 (2004).
- 125. A, A. *et al.* A biocompatible polysaccharide hydrogel-embedded polypropylene mesh for enhanced tissue integration in rats. *Tissue engineering. Part A* vol. 14 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18370927/ (2008).
- 126. Kamath, K. R. & Park, K. Biodegradable hydrogels in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **11**, 59–84 (1993).
- 127. Yang, H. *et al.* Damage and protection of UC blood cells during cryopreservation. *Cytotherapy*3, 377–386 (2001).
- 128. Foïs, E. *et al.* Recovery, viability and clinical toxicity of thawed and washed haematopoietic progenitor cells: analysis of 952 autologous peripheral blood stem cell transplantations. *Bone Marrow Transplant.* **40**, 831–835 (2007).
- 129. Stolzing, A., Naaldijk, Y., Fedorova, V. & Sethe, S. Hydroxyethylstarch in cryopreservation Mechanisms, benefits and problems. *Transfus. Apher. Sci.* **46**, 137–147 (2012).
- 130. Gao, D. & Critser, J. K. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. ILAR J. 41, 187–196 (2000).
- 131. Mazur, P. A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to cryobiology. *Cryobiology* **60**, 4–10 (2010).
- 132. Royere, D., Barthelemy, C., Hamamah, S. & Lansac, J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Hum. Reprod. Update* **2**, 553–559 (1996).

- 133. Stoop, D., Cobo, A. & Silber, S. Fertility preservation for age-related fertility decline. *Lancet Lond. Engl.* **384**, 1311–1319 (2014).
- 134. McGann, L. E., Yang, H. & Walterson, M. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology* **25**, 178–185 (1988).
- 135. Baudot, A., Alger, L. & Boutron, P. Glass-Forming Tendency in the System Water–Dimethyl Sulfoxide. *Cryobiology* **40**, 151–158 (2000).
- 136. Gorin, N. C. Collection, manipulation and freezing of haemopoietic stem cells. *Clin. Haematol.***15**, 19–48 (1986).
- 137. Fry, L. J. *et al.* Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation. *Vox Sang.* **109**, 181–190 (2015).
- 138. Lasky, L. The role of the laboratory in marrow manipulation. Arch. Pathol. Lab. Med. (1991).
- 139. Alessandrino, P. *et al.* Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases. *Bone Marrow Transplant.* **23**, 533–537 (1999).
- 140. Latchana, N., Peck, J. R., Whitson, B. & Black, S. M. Preservation solutions for cardiac and pulmonary donor grafts: a review of the current literature. *J. Thorac. Dis.* **6**, 1143–1149 (2014).
- 141. Ferng, A. S. *et al.* Novel vs clinical organ preservation solutions: improved cardiac mitochondrial protection. *J. Cardiothorac. Surg.* **12**, 7 (2017).
- 142. Wood, K. M., Stone, G. M. & Peppas, N. A. The effect of complexation hydrogels on insulin transport in intestinal epithelial cell models. *Acta Biomater.* **6**, 48–56 (2010).
- 143. Caló, E. & Khutoryanskiy, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur. Polym. J.* **65**, 252–267 (2015).
- 144. Park, K. M. *et al.* Thermosensitive chitosan–Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration. *Acta Biomater.* **5**, 1956–1965 (2009).
- 145. Hennink, W. E. & van Nostrum, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 13–36 (2002).
- 146. Hauet, T. & Eugene, M. A new approach in organ preservation: potential role of new polymers. *Kidney Int.* **74**, 998–1003 (2008).
- 147. Vrana, N. E., O'Grady, A., Kay, E., Cahill, P. A. & McGuinness, G. B. Cell encapsulation within PVA-based hydrogels via freeze-thawing: a one-step scaffold formation and cell storage technique. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **3**, 567–572 (2009).
- 148. Vrana, N. E. *et al.* Cell encapsulation and cryostorage in PVA–gelatin cryogels: incorporation of carboxylated ε-poly-L-lysine as cryoprotectant. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **6**, 280–290 (2012).
- 149. Nagatomo, H., Yao, T., Araki, Y., Mizutani, E. & Wakayama, T. Agarose capsules as new tools for protecting denuded mouse oocytes/embryos during handling and freezing-thawing and supporting embryonic development in vivo. *Sci. Rep.* **7**, 17960 (2017).

- 150. Pravdyuk, A. I., Petrenko, Y. A., Fuller, B. J. & Petrenko, A. Y. Cryopreservation of alginate encapsulated mesenchymal stromal cells. *Cryobiology* **66**, 215–222 (2013).
- 151. Durkut, S., Elçin, A. E. & Elçin, Y. M. In vitro evaluation of encapsulated primary rat hepatocytes pre- and post-cryopreservation at -80°C and in liquid nitrogen. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **43**, 50–61 (2015).
- Shu, Z., Chen, W., Shen, A. Q. & Gao, D. C-13: Application of hydrogel in cryopreservation as a novel cryoprotectant, encapsulation and single-cell-based functional sensing material. *Cryobiology* 69, 506 (2014).
- 153. Saccardi, R. *et al.* Impact of cord blood banking technologies on clinical outcome: a Eurocord/Cord Blood Committee (CTIWP), European Society for Blood and Marrow Transplantation and NetCord retrospective analysis. *Transfusion (Paris)* **56**, 2021–2029 (2016).
- 154. Zdolsek, J. H., Bergek, C., Lindahl, T. L. & Hahn, R. G. Colloid osmotic pressure and extravasation of plasma proteins following infusion of Ringer's acetate and hydroxyethyl starch 130/0.4. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **59**, 1303–1310 (2015).
- 155. Pfaff, R. T. *et al.* Water and DMSO membrane permeability characteristics of in-vivo- and invitro-derived and cultured murine oocytes and embryos. *Mol. Hum. Reprod.* **4**, 51–59 (1998).
- 156. Spindler, R., Rosenhahn, B., Hofmann, N. & Glasmacher, B. Video analysis of osmotic cell response during cryopreservation. *Cryobiology* **64**, 250–260 (2012).
- 157. Carvalho, J., Moreira, S., Maia, J. & Gama, F. M. Characterization of dextrin-based hydrogels: rheology, biocompatibility, and degradation. *J. Biomed. Mater. Res. A* **93**, 389–399 (2010).
- 158. Zhang, N., Shen, Y., Li, X., Cai, S. & Liu, M. Synthesis and characterization of thermo- and pHsensitive poly(vinyl alcohol)/poly(N, N-diethylacrylamide-co-itaconic acid) semi-IPN hydrogels. *Biomed. Mater. Bristol Engl.* **7**, 035014 (2012).
- 159. Temenoff, J. S., Athanasiou, K. A., LeBaron, R. G. & Mikos, A. G. Effect of poly(ethylene glycol) molecular weight on tensile and swelling properties of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels for cartilage tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* **59**, 429–437 (2002).
- 160. Bromberg, L., Grosberg, A. Yu., Matsuo, E. S., Suzuki, Y. & Tanaka, T. Dependency of swelling on the length of subchain in poly(N,N-dimethylacrylamide)-based gels. *J. Chem. Phys.* **106**, 2906–2910 (1997).
- De Santis, L. & Coticchio, G. Reprint of: Theoretical and experimental basis of slow freezing. *Reprod. Biomed. Online* 23, 290–297 (2011).
- Drake, A. C. *et al.* Effect of water content on the glass transition temperature of mixtures of sugars, polymers, and penetrating cryoprotectants in physiological buffer. *PloS One* **13**, e0190713 (2018).

- 163. Biggs, C. I. *et al.* Polymer mimics of biomacromolecular antifreezes. *Nat. Commun.* **8**, 1546 (2017).
- 164. Hanslick, J. L. *et al.* Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol. Dis.* **34**, 1–10 (2009).
- 165. Chagas, M. a. B. *et al.* Effect of red blood cell preservation by droplet freezing with nonpermeable cryoprotective agents in blood group antigen reactivity. *Transfus. Med. Oxf. Engl.* **27**, 142–146 (2017).
- 166. Inada, and T. & Lu, S. Inhibition of recrystallization of ice grains by adsorption of poly(vinyl alcohol) onto ice surfaces. (2003) doi:10.1021/CG0340300.
- 167. Gurtovenko, A. A. & Anwar, J. Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. *J. Phys. Chem. B* 111, 10453–10460 (2007).
- 168. Lee, J. *et al.* Ovarian injury during cryopreservation and transplantation in mice: a comparative study between cryoinjury and ischemic injury. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **31**, 1827–1837 (2016).
- 169. Kim, G. A. *et al.* Effectiveness of slow freezing and vitrification for long-term preservation of mouse ovarian tissue. *Theriogenology* **75**, 1045–1051 (2011).
- 170. Lee, J. R. *et al.* Effect of Antifreeze Protein on Mouse Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation. *Yonsei Med. J.* **56**, 778–784 (2015).
- Youm, H. W. *et al.* Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified-warmed ovarian tissue survival. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 29, 720–730 (2014).
- 172. Liu, L. *et al.* Restoration of fertility by orthotopic transplantation of frozen adult mouse ovaries. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **23**, 122–128 (2008).
- 173. Choi, W.-J. *et al.* Expression of angiogenic factors in cryopreserved mouse ovaries after heterotopic autotransplantation. *Obstet. Gynecol. Sci.* **58**, 391–396 (2015).
- 174. Lundy, T., Smith, P., O'Connell, A., Hudson, N. L. & McNatty, K. P. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *Reproduction* **115**, 251–262 (1999).
- 175. Soleimani, R., Heytens, E. & Oktay, K. Enhancement of Neoangiogenesis and Follicle Survival by Sphingosine-1-Phosphate in Human Ovarian Tissue Xenotransplants. *PLOS ONE* **6**, e19475 (2011).
- 176. Fabbri, R. *et al.* Ovarian tissue banking and fertility preservation in cancer patients: histological and immunohistochemical evaluation. *Gynecol. Oncol.* **89**, 259–266 (2003).
- 177. Maltaris, T. *et al.* The use of an open-freezing system with self-seeding for cryopreservation of mouse ovarian tissue. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* **40**, 250–254 (2005).

- 178. Campos, J. R. *et al.* Cryopreservation time does not decrease follicular viability in ovarian tissue frozen for fertility preservation. *Clinics* **66**, 2093–2097 (2011).
- Pereira, J., Ferraretto, X., Patrat, C. & Meddahi-Pellé, A. Dextran-Based Hydrogel as a New Tool for BALB/c 3T3 Cell Cryopreservation Without Dimethyl Sulfoxide. *Biopreservation Biobanking* 17, 2–10 (2019).
- 180. Weng, L. & Beauchesne, P. R. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation for cell therapy: A review. *Cryobiology* (2020) doi:10.1016/j.cryobiol.2020.03.012.
- 181. Baust, J. M., Vogel, M. J., Van Buskirk, R. & Baust, J. G. A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival. *Cell Transplant.* **10**, 561–571 (2001).
- 182. Yan, J. *et al.* Effects of duration of cryo-storage of mouse oocytes on cryo-survival, fertilization and embryonic development following vitrification. *J. Assist. Reprod. Genet.* **28**, 643–649 (2011).
- 183. Stigliani, S. *et al.* Storage time does not modify the gene expression profile of cryopreserved human metaphase II oocytes. *Hum. Reprod.* **30**, 2519–2526 (2015).
- 184. Rienzi, L. *et al.* Definition of a clinical strategy to enhance the efficacy, efficiency and safety of egg donation cycles with imported vitrified oocytes. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **35**, 785–795 (2020).
- 185. Turnbull, D. Formation of Crystal Nuclei in Liquid Metals. J. Appl. Phys. 21, 1022–1028 (1950).
- 186. Youm, H. W. *et al.* Transplantation of mouse ovarian tissue: comparison of the transplantation sites. *Theriogenology* **83**, 854–861 (2015).
- 187. Bagis, H., Akkoç, T., Tasş, A. & Aktoprakligil, D. Cryogenic effect of antifreeze protein on transgenic mouse ovaries and the production of live offspring by orthotopic transplantation of cryopreserved mouse ovaries. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 608–613 (2008).
- 188. Migishima, F. *et al.* Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol. Reprod.* **68**, 881–887 (2003).
- 189. Lee, J. *et al.* Effects of three different types of antifreeze proteins on mouse ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *PloS One* **10**, e0126252 (2015).
- Zhang, J.-M., Sheng, Y., Cao, Y.-Z., Wang, H.-Y. & Chen, Z.-J. Effects of cooling rates and ice-seeding temperatures on the cryopreservation of whole ovaries. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28, 627–633 (2011).

Annexes

Annexes



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR, DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION

Paris, le 1^{er} avril 2020

Objet : Notification de décision relative à l'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, le projet :

- référencé sous le numéro APAFIS#21922-2019090912234528 v8
- ayant pour titre : Cryopreservation à l'aide d'un hydrogel et autogreffe de cortex ovarien chez la souris
- déposé par l'établissement utilisateur : INSERM U 1148, numéro d'agrément D751803, dont le responsable est Monsieur Didier LETOURNEUR,
- et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est assurée par : Madame Rachida AID, Madame Anne PELLÉ, Monsieur Xavier FERRARETTO,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'établissement utilisateur, pour une durée de 1 an à compter de la présente notification.

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le comité d'éthique en expérimentation animale n°121 et a reçu un avis favorable.

Toutefois, **le comité d'éthique a proposé le reclassement** de la procédure expérimentale N°1 du projet de la classe « modérée » à la classe « sévère ».

Ce projet fera l'objet, à l'issue de sa réalisation, d'une appréciation rétrospective. Il vous appartiendra de prendre contact directement avec le comité d'éthique.

Pour la ministre et par délégation le chef du département des pratiques de recherche réglementées

Laurent PINON

Monsieur Didier LETOURNEUR INSERM U 1148

Direction générale de la recherche et de l'innovation

Service de la performance, du financement et de la contractualisation avec les organismes de recherche

Département des pratiques de recherche réglementées

Cellule Animaux utilisés à des Fins Scientifiques - AFiS -

Affaire suivie par Véronique Delassault Responsable administrative de la cellule AFiS

Tél : 01 55 55 97 27 veronique.delassault @recherche.gouv.fr

autorisation-projet @recherche.gouv.fr

1 rue Descartes 75231 Paris Cedex 05



8		
2019090912234528		
Cryopreservation à l'aide d'un hydrogel et autogreffe de cortex ovarien chez la souris		
1		
0		
0		
Oui		

Il existe actuellement une augmentation du nombre de cancers chez les jeunes enfants d'environ 0,6% par année, associée à une amélioration des traitements anti-cancéreux. En conséquence des jeunes adultes de plus en plus nombreux vont devoir faire face aux séquelles potentielles des traitements, parmi lesquelles les difficultés à concevoir un enfant. L'impact de ces traitements sur la fertilité varie en fonction de plusieurs éléments : du type de traitement, du type de molécule, de la chirurgie effectuée, du sexe du patient et de son âge.

La méthode de préservation de la fertilité pour les jeunes filles n'ayant pas encore réalisées leur puberté actuellement proposée reste au stade expérimental. En effet c'est la congélation de morceaux d'ovaire qui reste la seule solution existante pour permettre aux jeunes filles pré-pubères de préserver leur fertilité avant un traitement potentiellement stérilisant : radiothérapie et/ou chimiothérapie par exemple. La méthode utilisée actuellement est une méthode de congélation lente utilisant des agents anti-gèles qui rentrent dans les cellules qui sont connus pour leur toxicité et pouvant entrainer des dommages cellulaires ou génétiques, ceux-ci étant corrélés aux concentrations utilisées. De plus la survie des follicules primordiaux (à l'origine des ovocytes) de ces patientes est plutôt médiocre avec cette technique de congélation : de l'ordre de 50% des follicules intacts après décongélation. Il a été développé un gel à base d'un sucre qui est compatible avec les tissus vivants et qui a aussi démontré son absence de toxicité. Il possède notamment des propriétés d'absorption du milieu liquide environnant et a été testé dans la congélation de cellules musculaires de souris avec des résultats très encourageants et déjà publiés. Notre objectif est d'adapter ce gel à la congélation de cortex ovarien ce qui nous permettrait de diminuer de façon importante les concentrations en agents anti-gèles et ainsi leurs effets secondaires, mais aussi d'améliorer les résultats de la congélation de cortex ovarien (proportion de follicules intacts après décongélation).

Le modèle d'autogreffe d'ovaire chez la souris, où la souris hôte est la même que le souris source, sous la capsule rénale est le modèle le mieux adapté afin d'étudier la reprise post congélation/décongélation d'un ovaire greffé. En effet il permet d'évaluer le développement des follicules et leur survie. Ceux-ci sont à l'origine des ovocytes nécessaires à la reproduction. De plus il permet d'étudier la fonction endocrine de l'ovaire, c'est-à-dire les hormones qu'il sécrète dans le sang et qui permettent la régulation de plusieurs processus comme le cycle menstruel ou la puberté. Il permet donc de refléter au mieux le processus de congélation/décongélation et de greffe de cortex ovarien chez l'humain et les attentes que l'on peut en avoir en application clinique.

Notre projet nécéssite d'avoir recours à des souris car à ce jour il n'existe pas de méthodes alternatives pour modéliser la greffe d'ovaire post congélation/décongélation, l'utilisation d'un modèle animal est donc nécessaire pour évaluer l'efficacité de ce dispositif de congélation.

Cependant nous avons voulu limiter le nombre d'animaux utilisés et leurs souffrances.

Tout d'abord des mesures nécessaires seront prises pour limiter la douleur et le stress des animaux par l'utilisation d'anesthésiants et d'analgésiques au cours des différentes interventions : prélèvement des ovaires puis autogreffe. Un suivi du bien-être des animaux sera effectué par des personnes compétentes au cours de ce projet avec un contrôle régulier de l'état de santé des animaux avec recours aux analgésiques si nécessaires. Des points limites précoces de bien être et d'état de santé des souris ont été définis avec la mise en place d'une grille d'évaluation basée sur l'apparence physique et la mobilité des animaux.

Pour réaliser cette étude nous avons tenu compte du nombre minimal d'animaux à étudier de façon à obtenir les

informations scientifiques recherchées. Ainsi le nombre d'animaux utilisés pour la période du projet a été évalué à 60 pour la totalité du projet : 20 souris par groupe (un groupe référence, un groupe expérimental et un groupe contrôle). Le projet sera effectué sur une période d'un an. L'ensemble des animaux sera euthanasié à la fin de l'expérience après anesthésie.

3. Informations Administratives et Réglementaires

3.1. L'Etablissement Utilisateur

3.1.1. Agrément de l'Etablissement Utilisateur (EU) où seront utilisés les animaux

Nom de l'Etablissement Utilisateur	Animalerie U1148
Numéro d'agrément	D75-18-03
Date de délivrance de l'agrément	19.02.2018
Civilité	Monsieur
NomResponsable	Letourneur
Prénom du responsable	Didier
Email du responsable	didier.letourneur@inserm.fr
Civilité	Madame/Mademoiselle
Nom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU	Arocas
Prénom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU	Véronique
Email de ce délégataire	veronique.arocas@inserm.fr
1.2 Paspanable(a) de la mise en muyre gén	árala du projet dans l'ELL et de se conformitá à

3.1.2. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à

l'autorisation de projet

Nombre de responsables 3

Page 3
Civilité	Madame/Mademoiselle Aid			
Nom				
Prénom	Rachida	Rachida		
Adresse Postale				
Nom du laboratoire	Inserm U1148			
Voie	rue Henri Huchard			
Code Postal	75018			
Ville	Paris			
Pays	France rachida.aid@inserm.fr			
Email				
Numéro de téléphone	0140257540	0140257540		
oordonnées du responsable				
Civilité	Madame/Mademoiselle			
Nom	Pellé			
Prénom	Anne	Anne		
Adresse Postale				
Nom du laboratoire	Inserm U1148			
Numéro	46			
Voie	rue Henri Huchard	rue Henri Huchard		
Code Postal	75018			

Civilité	Madame/Mademoiselle Aid			
Nom				
Prénom	Rachida	Rachida		
Adresse Postale				
Nom du laboratoire	Inserm U1148			
Voie	rue Henri Huchard			
Code Postal	75018			
Ville	Paris			
Pays	France rachida.aid@inserm.fr			
Email				
Numéro de téléphone	0140257540	0140257540		
oordonnées du responsable				
Civilité	Madame/Mademoiselle			
Nom	Pellé			
Prénom	Anne	Anne		
Adresse Postale				
Nom du laboratoire	Inserm U1148			
Numéro	46			
Voie	rue Henri Huchard	rue Henri Huchard		
Code Postal	75018			

Ville	Paris	
Pays	France	
Email	anne.pelle@inserm.fr	
Numéro de téléphone	0140257540	
Coordonnées du responsable		
Civilité	Monsieur	
Nom	Ferraretto	
Prénom	Xavier	
Adresse Postale		
Nom du laboratoire	Inserm U1148	
Numéro	46	
Voie	rue Henri Huchard	
Code Postal	75018	
Ville	Paris	
Pays	France	
Email	xavier.ferraretto@aphp.fr	
Numéro de téléphone	0140258884	
3.1.3. Responsable(s) du bien être des a	animaux	
Nombre de responsables	4	
Coordonnées du responsable		
Civilité	Madame/Mademoiselle	

Nom	Arocas Véronique				
Prénom					
Adresse Postale					
Nom du laboratoire	Animalerie U1148				
Complément	Batiment INSERM, Hopital Bichat				
Numéro	46 rue Henri Huchard				
Voie					
Code Postal	75018				
Ville	Paris France veronique.arocas@inserm.fr				
Pays					
Email					
Numéro de téléphone	0140258600				
Coordonnées du responsable					
Civilité	Madame/Mademoiselle				
Nom	Delbosc				
Prénom	Sandrine				
Adresse Postale					
Nom du laboratoire	Animalerie U1148				
Complément	Batiment INSERM, Hôpital Bichat				
Numéro	46				
Voie	rue Henri Huchard				
Code Postal					

	75018				
Ville	Paris				
Pays	France				
Email	sandrine.delbosc@inserm.fr				
Numéro de téléphone	0140257556				
Coordonnées du responsable					
Civilité	Monsieur				
Nom	Dupont				
Prénom	Sébastien				
Adresse Postale					
Nom du laboratoire	Animalerie U1148				
Complément	Batiement INSERM, Hôpital Bichat				
Numéro	46				
Voie	rue Henri Huchard				
Code Postal	75018				
Ville	Paris				
Pays	France				
Email	sebastien.dupont86@gmail.com				
Numéro de téléphone	0140258600				
Coordonnées du responsable					
Civilité	Monsieur				
Nom	Anh-hu				

Prénom	Gaston		
Adresse Postale			
Nom du laboratoire	Animalerie U1148		
Complément	Batiment INSERM, Hôpital Bichat		
Numéro	46		
Voie	rue Henri Huchard		
Code Postal	75018		
Ville	Paris		
Pays	France		
Email	athugaston@yahoo.fr		
Numéro de téléphone	0140257558		
3.2. Le Personnel			
Conception des procédures expérimentales et des projets	Oui		
Application de procédures expérimentalles aux animaux	Oui		
Soins aux animaux	Oui		
Mise à mort des animaux	Oui		
3.3. Le Projet			
3.3.1. Objectif du projet			
Le projet est-il			
Justifié d'un point de vue scientifique	Oui		
Informations concernant cette(ces) justification(s)			

Ce projet fait partie d'une thématique de recherche sur le développement de nouveau cryoprotecteurs approuvé et suivi par la SATT Ile-de-France Innov. L'hydrogel utilisé pour cette congélation a été breveté et nous avons déjà publié des résultats très encourageant sur la congléation de cellules BALBc/3T3 avec cet hydrogel et en absence de cryoprotecteur pénétrant (dimethylsulfoxide (DMSO)). Il s'inscrit aussi dans les thématiques de recherche du Laboratory of Vascular Translational Science (unité Inserm 1148) validé par l'Inserm et l'HCERES et fait l'objet d'une thèse de science.

3.3.2. Description du projet

Il existe actuellement une augmentation de l'incidence des cancers chez les jeunes enfants d'environ 0,6% par année, associée à une amélioration des traitements anti-cancereux. En conséquence des jeunes adultes de plus en plus nombreux vont devoir faire face aux séquelles potentielles des traitements, parmi lesquelles les difficultés à concevoir un enfant. L'impact de ces traitements sur la fertilité varie en fonction de plusieurs éléments : du type de traitement, du type de molécule, de la chirurgie effectuée, du sexe du patient et de son âge.

La préservation de la fertilité est en général facile chez l'homme mais plus difficile car plus récente chez la femme, l'enfant et l'adolescent. Pour les femmes post-pubères la méthode qui prédomine la préservation de la fertilité est la vitrification d'ovocytes matures, technique qui a prouvé son efficacité. En revanche, pour les femmes pré-pubères ou pour celles devant bénéficier d'un traitement pouvant rendre stérile dont le délai ne permet pas une stimulation ovarienne ou ayant une contre-indication à la stimulation ovarienne, la congélation de cortex ovarien est actuellement proposée mais reste au stade expérimental. La congélation lente semble encore à l'heure actuelle la méthode de référence pour la préservation de cortex ovarien. La restauration de la fertilité et de la fonction ovarienne est assurée ultérieurement, par la greffe de tissu ovarien après décongélation, en position orthotopique ou hétérotopique. Grâce à cette technique, une soixantaine d'enfants est née à ce jour.

La technique actuelle de congélation lente pour les fragments de cortex ovarien réside dans l'utilisation de cryoprotecteurs et d'une descente lente et maitrisée en température. L'agent cryoprotecteur le plus couramment utilisé pour la congélation de cortex ovarien est le DMSO.

Cependant cette technique de congélation lente, utilisée en routine dans les laboratoires de Biologie de la Reproduction, comporte deux limites majeures. La première est la survie des follicules primordiaux et des ovocytes qu'ils contiennent après un cycle de congélation/décongélation. Celle-ci est de l'ordre de 50% de follicules intacts. Bien que suffisante pour obtenir dans certains cas des grossesses évolutives à l'âge adulte avec des naissances vivantes, nous pensons qu'elles pourraient être grandement améliorées par des nouvelles techniques de congélation et ainsi augmenter les chances de grossesses et de naissances vivantes pour ces femmes. La seconde limite relative à cette technique de congélation est l'utilisation de DMSO qui possède une toxicité cellulaire qui peut conduire à des dommages cellulaires lorsqu'il est utilisé à des concentrations élevées. Pour limiter les effets secondaires liés aux cryoprotecteurs, de nombreuses recherches sur d'autres cryoprotecteurs non-pénétrants ont été effectuées. Le dextran, un polysaccharide, est l'un d'entre eux : cette molécule de grade clinique utilisée initialement dans des solutés de remplissage n'a aucun effet mutagène, carcinogène ou toxique. Le dextran possède la capacité à pouvoir être complexé sous forme d'hydrogels.

Une des thématiques de notre équipe de recherche est de développer des biomatériaux dans diverses applications médicales. Elle a notamment développé un hydrogel à base de dextran, biocompatible et biodégradable conçu pour l'ingénierie cellulaire et tissulaire. Ce dernier a fait l'objet d'un brevet déposé en 2012. Nous avons déjà utilisé cet hydrogel pour la congélation de cellules 3T3 sans ajout de cryoprotecteur en le comparant à la méthode standard de congélation qui utilise du DMSO. La technique de congélation par hydrogel a montré des résultats comparables à la technique de référence en termes de viabilité cellulaire après un cycle de congélation/décongélation. L'hydrogel n'a par ailleurs montré aucune cytotoxicité lors des tests effectués selon les normes ISO 10993-5 et 10993-12. L'objectif de cette étude est d'utiliser cet hydrogel dans la congélation lente de cortex ovarien de souris en le

comparant à la méthode de référence utilisant le DMSO à 1,5M. Afin de parvenir à cet objectif nous envisageons un modèle de prélèvement et auto-greffe d'ovaires chez la souris.

Dans un premier temps les ovaires seront prélevés sous anesthésie et analgésie. A cette étape les souris scham (contrôles) seront juste incisées et suturées sans que les ovaires ne soient prélevés. Les ovaires des souris prélevées seront ensuite congelés puis décongelés selon le protocole de référence utilisant 1,5M de DMSO et selon notre protocole de congélation expérimentale utilisant l'hydrogel et des concentrations très réduites en DMSO (0,5M). Après ce cycle de congélation et décongélation les ovaires seront auto-greffés sous anesthésie et analgésie sous la capsule rénale chez les souris déjà prélevées. A cette étape les souris scham seront incisés et suturés mais aucun ovaire ne leur sera greffé.

Enfin 7 ou 21 jours après le jour de la greffe les ovaires de l'ensemble des souris (scham incluses) seront prélevés après sacrifice des animaux afin de réaliser des analyses histologiques de comptage des follicules primordiaux et marquage de la vitalité par Caspase 3. Le sang des souris sacrifiées sera aussi prélevé afin de réaliser des dosages biochimiques hormonaux (Estradiol). Les ovaires seront conservés après inclusion en paraffine et les prélèvement sanguins congelés. Pour réaliser cette étude nous avons tenu compte du nombre d'animaux à évaluer de facon à obtenir les informations scientifiques recherchées en fonction des risques statistiques d'erreur (5%) et de la puissance des tests (80%). Le nombre d'animaux utilisés pour la période du projet a été évalué à 60 sur 1 ans. Durant tout le projet un suivi du bien-être des animaux sera fait par des personnes compétentes au par un contrôle régulier de l'état de santé des animaux avec recours au analgésigues si nécessaires. Une grille d'évaluation du bienêtre des animaux sera mise en place et si l'animal présente des signes de souffrance relatifs aux points limites définis au cours de la durée de l'expérimentation, une injection de buprénorphine en sous cutanée est réalisée. Si les symptômes persistent où sont trop sévères. l'animal sera euthanasié. Aussi les souris seront placées seules dans chacune des cages pour le bon déroulement de l'expérience car les animaux risqueraient d'atteindre les plaies et se mutiler, ce qui pourrait compromettre toute l'étude. Pour pallier cet isolement, les cages seront enrichies avec du matériel de nidification et des rouleaux. L'ensemble des animaux sera sacrifié à la fin de l'expérience. A ce jour, il n'existe pas d'autres alternatives comparables pour analyser la reprise post greffe d'un ovaire congelé.

3.3.3. Précisez, le cas échéant, la (ou les) méthode(s) de mise à mort prévue(s)

La mise à mort sera effectuée par élongation cervicale sous anesthésie.

3.3.4. Précisez, le cas échéant, les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation concernant la méthode de mise à mort envisagée :

N.A

3.3.5. Stratégie d'expérimentation ou d'observation et approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées, et l'impact environnemental, le cas échéant – si une étude statistique est prévue, indiquez et justifiez les tests choisis :

Il n'existe pas de méthodes alternatives pour remplacer l'expérimentation in vivo. . Le nombre de souris utilisé et le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables (test de Kruskall Wallis) et atteindre notre objectif scientifique. Il a été calculé d'après un test de puissance réalisé avec le logiciel InVivoStat(r) avec une puissance et un risque respectivement de à 80% et 5%. Les interventions douloureuses ou angoissantes sont réalisées sous anesthésie et un monitoring de l'analgésie pré-, per- et post-opératoire sera réalisé avec ajustement des doses d'anti douleurs le cas échéant. En post opératoire immédiat les souris serons surveillées étroitement jusqu'à la phase de réveil. Une injection de buprenorphine (0,01mg/kg) sera réalisée pour réduire la douleur de l'animal en fin d'intervention. En post-opératoire les animaux seront surveillés toutes les heures en contrôlant leur état général (apparence physique) et l'état de la plaie jusqu'à la fin de la journée de travail. L'état général et des plaies seront ensuite évaluée quotidiennement pendant toute la durée de l'expérimentation. Tout au long de l'expérimentation une grille d'évaluation sera mise en place afin de déterminer le bien-être des animaux (cf annexe : Grille d'évaluation). Si l'animal atteint un score de 3 ou 4, il recevra une injection sous cutanée de buprenorphine (0,05mg/kg). Pour un score de 5 ou plus, ou si les symptômes persistent, l'animal sera euthanasié par élongation cervicale sous anesthésie.

3.4. Les Animaux

3.4.1. Justifiez d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet

Le prélèvement puis la greffe d'ovaire de souris est actuellement le modèle le plus utilisé dans la littérature pour valider la méthode de congélation avant application chez l'humain. Il n'existe pas de modèle in vitro de greffe d'ovaire permettant de réaliser une évaluation comparable. Le modèle de greffe in vivo est le seul modèle permettant d'évaluer la viabilité, la fonction endocrine et exocrine d'un ovaire après prélèvement et un cycle de congélation/décongélation tel qu'il est réalisé chez l'humain en préservation de la fertilité féminine. En effet seule la greffe permet d'évaluer la revascularisation du greffon et sa fonctionnalité post transplantation. L'objectif in fine de la congélation de cortex ovarien chez l'humain étant la restauration de la fertilité et de la fonction endocrine ovarienne (ex. induction de la puberté).

3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés

Souris (Mus musculus) Oui

3.4.3. Justifiez la pertinence de l'(des) espèce(s) choisie(s)

La souris est le modèle de référence dans l'étude expérimentale de la congélation ovarienne. Ce modèle d'autogreffe post congélation/décongélation d'ovaire est le mieux décrit et le plus pratiqué dans la littérature scientifique.

3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées Non à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9

décembre 1996 relatif à la protection des espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle et leur commerce ?

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ?		
3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ?	Non	
3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ?	Non	
3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le p	orojet :	

Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques)

Oui

3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou

1

de fournisseurs agréés ?

Oui

Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur	
agréés fournissant tout ou partie des animaux du	
projet	

Etablissement éleveur

Nom de l'établissement	JANVIER LABS
	0, 1111111111111

Adresse postale

Nom du laboratoire	JANVIER LABS
Complément	ELEVAGE JANVIER
Numéro	CS 4105 Le Genest St Isle 53941 St Berthevin Cedex
Voie	CS

Code Postal	53941
Ville	St berthevin cedex
Pays	France
Animaux fournis	Souris
Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ?	Non
Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ?	Non
Etablissements éleveurs occasionnels non ag	gréés fournissant tout ou partie des animaux du projet
Nombre d'établissements	0
Etablissements éleveurs ou fournisseurs loca	lisés dans des Etats membres autres que la France
fournissant tout ou partie des animaux du pro	jet
Nombre d'établissements	_ 0
Etablissements éleveurs ou fournisseurs loca	lisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des
animaux du projet	
Nombre d'établissements	0
Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent?	Non
Animaux utilisés	
3.4.10. Nombre d'animaux utilisés dans le projet	60
Justification de ce nombre pour chacune des espèces anima	les utilisées

Afin d'obtenir une puissance statistique suffisante comprenant la variabilité des réponses, 8 animaux par groupe seront nécessaires. Nous avons également prévu la perte possible d'animaux liée à la procédure expérimentale, le nombre d'animaux est alors augmenté de 20% soit 10 animaux par groupe. Notre procédure comporte 3 groupes : 2 groupes expérimentaux et un groupe témoin avec deux temps de prélèvement pour chaque groupe (J7 et J21 post-greffe) soit un total de 3x2=6 groupes. Un total de 60 souris est donc nécessaire pour mener ce projet.

3.4.11. Indiquez à quel(s) stade(s) de développement les animaux seront utilisés et le justifier

Souris de 4 semaines pour se rapprocher le plus possible de l'ovaire pré-pubère humain.

3.4.12. Indiquer le sexe des animaux et le justifier

Cette étude sera effectuée uniquement sur des souris femelle compte tenu de l'organe utilisé.

3.4.13. Indiquer pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

Concernant les interventions douloureuses ou angoissantes (prélèvement et greffe d'ovaire), celles-ci sont réalisées sous anesthésie et un monitoring de l'analgésie pré-, per- et post-opératoire sera réalisé avec ajustement des doses d'anti douleurs le cas échéant. En et per- et post-opératoire immédiat les souris serons surveillées étroitement jusqu'à la phase de réveil complet par contrôle d'absence de réflexe et contrôle visuel de la fréquence respiratoire. Une injection de buprenorphine (0,01mg/kg) sera réalisée pour réduire la douleur de l'animal en fin d'intervention. En post-opératoire les animaux seront surveillés toutes les heures en contrôlant leur état général (apparence physique) et l'état de la plaie jusqu'à la fin de la journée de travail. L'état général et des plaies seront ensuite évaluée quotidiennement pendant toute la durée de l'expérimentation. Tout au long de l'expérimentation deux grilles d'évaluation seront mises en place afin de déterminer le bien-être des animaux (cf annexe : Grilles d'évaluation). Dès que l'animal a un score de 1, 2 ou B, il sera surveillé et évalué deux fois par jour afin de détecter toute dégradation rapide de son état et agir en conséquence. Si l'animal atteint un score de 3, 4 ou C, il recevra une injection sous cutanée de buprenorphine (0,05mg/kg). Pour un score ≥5 ou D, ou si les symptômes persistent, l'animal sera euthanasié par élongation cervicale sous anesthésie.

4. Procédures Expérimentales

4.1.	Obiet	(s)	visé(s)	par	les	procédures	expérime	entales
	Coju	()	100(0)	pui	100	procoduroo	onportine	incaroo

A - La recherche fondamentale Oui

Description des procédures

Nombre de procédures

1

Procedure

Nom de la procédure

Prélèvement et autogreffe d'ovaire chez la souris et évaluation de la reprise du greffon après cryopréservation à l'aide d'un hydrogel.

Proposition de classification de la procédure selon le degré Classe sévère de sévérité

Description détaillée de la procédure expérimentale

Pertinence et justification de la procédure expérimentale

Le modèle d'autogreffe hétérotopique d'ovaire chez la souris est le mieux décrit dans la littérature et permet aussi de limite le nombre d'individus utilisés pour l'expérimentation.

L'ensemble de la procédure chirurgicale de prélèvement ovarien est décrite ci-dessous :

-Anesthésier la souris par une injection intrapéritonéale d'un mélange d'anesthésiques (kétamine/xylazine, 100mg/kg et 10mg/kg respectivement)

-Raser une zone 3cmx3cm de la tête jusqu'à la crête iliaque puis désinfecter la zone à la Bétadine dermique 10%.

-Faire une incision dorsale longitudinale de 2-3 cm.

-Faire une incision à travers le fascia à 1 cm latéralement à la ligne médiane. Disséquer sous le fascia jusqu'à atteindre cavité abdominale.

-Attraper le tissu adipeux entourant l'ovaire et externaliser celui-ci délicatement. Identifier l'ovaire et ligaturer la trompe à environ 0,5cm de l'ovaire.

-Prélever l'ovaire et replacer la trompe dans la cavité abdominale.

-Répéter l'opération pour l'ovaire controlatéral.

-Refermer les fascias et la peau avec du fil résorbable de 4-0 sur deux plans.

Concernant les souris témoins (sham), celles-ci seront incisées et suturées sans prélever les ovaires.

Afin d'éviter la douleur au réveil des animaux, de la buprénorphine sera injectée en sous-cutané à une dose de 0.01 mg/kg. Pendant la période de réveil, les animaux seront surveillés tous les jours jusqu'à la fin de

l'expérimentation par ndes personnes compétentes.

Les ovaires prélevés seront congelés par protocole de congélation lente dans deux milieux de congélation différents : le milieu de référence décrit dans la littérature contenant 1.5M de DSMO et le milieu expérimentale contenant 0.5M de DMSO et de l'hydrogel à une concentration de 40mg/mL.

Les ovaires seront ensuite décongelés une semaine après la congélation et auotgreffés de façon hétérotopique (sous la capsule rénale) chez les souris prélévés selon la procédure suivante :

-Anesthésier la souris par une injection intrapéritonéale d'un mélange d'anesthésiques (kétamine/xylazine, 100mg/kg et 10mg/kg respectivement)

-Raser une zone de 3cmx3cm de la tête jusqu'à la crête iliaque et désinfecter la zone à la Bétadine dermique 10%.

-Faire une incision dorsale longitudinale de 2-3 cm.

-Faire une incision à travers le fascia à 1 cm latéralement à la ligne médiane. Disséquer sous le fascia jusqu'à atteindre cavité abdominale.

-Externaliser délicatement le rein.

-Faire un trou dans la capsule rénale et y insérer en dessous l'ovaire à greffer après avoir injecté du sérum physiologique sous la capsule rénale afin qu'elle ne se déchire pas.

-Répéter l'opération pour l'ovaire controlatéral à partir de l'étape 3.

-Refermer les fascias et la peau avec du fil résorbable de 4-0 sur deux plans.

Concernant les souris témoins (sham), celles-ci seront incisées et suturées sans replacer d'ovaires.

Afin d'éviter la douleur au réveil des animaux, de la buprénorphine sera injectée en sous-cutané à une dose de 0,01 mg/kg.

Pendant la période de réveil, les animaux seront surveillés tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation par des personnes compétentes.

Enfin les ovaires de l'ensemble des souris seront prélevés à J7 et J21 post greffe après sacrifice par dislocation cervicale après anesthésie préalable (kétamine/xylazine 100mg/kg et 10mg/kg respectivement). Le sang total de la souris sera aussi prélevé après le sacrifice afin de réaliser des dosages hormonaux. Des analyse histologique et immuno-histologique seront réalisées sur les ovaires prélevés.

Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lot, et les justifier

Cette procédure sera réalisée selon 2 conditions de congélations décrites précédemment et 1 groupe contrôle. Dix animaux par groupe (3) et par temps (2) de prélèvement seront nécessaires soit 60 souris.

Toutes les souris soit 60 seront sacrifiés à la fin de l'expérimentation :

-30 souris pour la procédure de prélèvement ovarien à J7 post greffe

-30 souris pour la procédure de prélèvement ovarien à J21 post greffe

Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés

Pour les souris des groupes experimantaux (soit 40 souris) les ovaires seront prélevés puis greffés sous la capsule rénale après 7 jours.

Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Pendant l'intervention chirurgicale, les animaux seront placés sur une plaque chauffante régulée à 37°C. Ils seront tout au long de la procédure sous anesthésie administrée en intrapéritonéale (kétamine/xylazine, 100 mg/kg et 10 mg/kg). La profondeur de l'anesthésie sera contrôlée au cours de la chirurgie par absence de réflexes et contrôle visuel de la fréquence respiratoire. Au besoin, une anesthésie complémentaire pourra-être administrée à 1/3 de la dose initiale de kétamine. Une injection en sous-cutané de buprénorphine (0,01 mg/kg chez la souris) sera réalisée pour réduire la douleur de l'animal en fin d'intervention. Les animaux seront ensuite surveillés jusqu'à leur réveil puis placés seules avec accès à la nourriture et à l'eau ad libitum et enrichissement.

Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

Si l'animal présente des signes de souffrance relatifs aux points limites définis (3.4.13) au cours de la durée de l'expérimentation, une injection de buprénorphine en sous cutanée est réalisée. Si les symptômes persistent où sont trop sévères, l'animal sera euthanasié.

Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

Les souris seront placées seules dans chacune des cages pour le bon déroulement de l'expérience car les animaux risqueraient d'atteindre les plaies et se mutiler, ce qui pourrait compromettre toute l'étude. Pour pallier cet isolement, les cages seront enrichies avec du matériel de nidification et des rouleaux.

Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale

Mise à mort

Oui

Précisez les animaux concernés

Pour tous les animaux

Etat de la plaie	
Cicatrisation physiologique	Α
Points relachés sans infection	В
Signes legers d'infection : leger écoulement	С
Nécrose et infection importante : supuration	D

- A: évolution normale
- B: désinfection de la plaie et surveillance deux fois par jour
 C: B + injection de buprénorphine en sous-cutané
- D : sacrifice de l'animal

Grilles d'évaluation

Changement de po corporel	ids	Apparence physique		Comportement	
Normal	0	Normal	0	Normal	0
Perte de poids < 10%	1	Manque toilettage	1	Activité légèrement réduite	1
Perte de poids entre 10 et 20%	3	Poil ébouriffé, écoulements	2	Mobilité réduite, inactivité	2
Perte de poids >20%	5	Poil très ébouriffé, posture anormale	3	Immobilité ou agitation, automutilation	3

- Score 1 à 2 : surveillance deux fois par jour

- Score 3 à 4 : injection de buprénorphine en sous-cutané

- Score ≥ à 5 : sacrifice de l'animal

En cas de persistance des symptômes malgré l'injection de buprénorphine : sacrifice de l'animal

Xavier Ferraretto - Médecin Biologiste spécialisé en Biologie de la Reproduction Praticien Hospitalier, service de Biologie de la Reproduction – hôpital Bichat – Claude-Bernard

FERRARETTO Xavier, Maxime, Cyril né le 2 juillet 1984 à Ris-Orangis, en concubinage, 2 enfants Tel : 06 83 50 90 45 E-mail : <u>xavier.ferraretto@aphp.fr</u> ou <u>xavier.ferraretto@gmail.com</u> Adresse : 6 rue Emile Gilbert, 75012 Paris N° RPPS : 10100536365 - N° d'inscription au tableau : 75/82388

Compétences

Assistance Médicale à la Procréation :

- Maitrise de l'ensemble des techniques d'AMP.
- Consultation de couples en vue d'AMP.
- AMP en contexte viral.

Andrologie :

- Activité de consultation.
- Spermiologie diagnostique.
- Congélation/décongélation et préparation de sperme en vue d'AMP.
- Prise en charge des patients pour prélèvements testiculaires, épididymaires.

CECOS :

- Consultation de patients en vue d'autoconservation de spermatozoïdes.
- Consultation de patientes en vue d'autoconservation d'ovocytes
- Inclusion des couples receveurs de dons de sperme ou d'ovocytes.
- Inclusion des donneurs de sperme et donneuses d'ovocytes.
- Appariement donneur-receveurs.

■ Qualité :

- Rédaction de procédures techniques en vue de l'accréditation.
- Rédaction de protocoles de validation des techniques en vue de l'accréditation.
- Participation active dans la démarche qualité en vue de l'accréditation selon la norme ISO
 15189 du laboratoire de Biologie De la Reproduction (hôpital Bichat Claude-Bernard) : référent validation de
- méthode, référent gestion de l'informatique, référent contrôles de qualité internes et externes.
 Promotion du service : réalisation du site internet du centre d'AMP de Bichat Claude Bernard : http://fertilitebichat.aphp.fr

■ Biologie polyvalente :

- Validation des DES de biochimie, hématologie, virologie, bactériologie et parasitologie, mycologie.
- Gardes polyvalentes dans le laboratoire de garde de l'hôpital Bichat Claude-Bernard (cytologie, hémostase, biochimie, bactériologie et parasitologie).

Expérience professionnelle

Novembre 2020 – en cours : Praticien Hospitalier, service de Biologie de La Reproduction hôpital Bichat – Claude-Bernard, Dr Florence Eustache et participation aux gardes du laboratoire polyvalent de l'hôpital.

■ Novembre 2018 – Octobre 2020 : Praticien Hospitalier Contractuel, service de Biologie de La Reproduction hôpital Bichat – Claude-Bernard, Dr Florence Eustache et participation aux gardes du laboratoire polyvalent de l'hôpital.

Novembre 2014 – Octobre 2018 : Assistant Hospitalier Universitaire, service de Biologie de La Reproduction hôpital Bichat – Claude-Bernard, Pr Catherine Patrat et participation aux gardes du laboratoire polyvalent de l'hôpital.

■ Novembre 2013 - Octobre 2014 : Biologiste titulaire au laboratoire de biologie polyvalente de l'hôpital Claude-Galien à Quincy-sous-Sénart (Cerba, Novescia Paris-Sud).

Novembre 2008 - Octobre 2013 : Interne en Biologie Médiale des hôpitaux de Paris.

■ Novembre 2004 - Octobre 2008 : Externe de la faculté de Médecine UPMC Paris VI – Saint Antoine.

Formation médicale

■ Octobre 2013 - Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine : « Détection de l'ARN VIH-1 dans le plasma séminal chez des patients sous thérapie antirétrovirale combinée avec une charge virale indétectable dans le sang ». Médaille d'argent.

Octobre 2013 - D.E.S de Biologie Médicale spécialité Biologie De la Reproduction

2008-2013 - Internat en Médecine, Biologie Médicale - Biologie De la Reproduction :

Stages niveau 2

7^{ème} et 8^{ème} semestres : Biologie De la Reproduction – CECOS, Pr. Poirot, Pr. Levy, hôpital Tenon

5^{ème} et 6^{ème} semestres : Biologie De la Reproduction, Pr. Patrat, hôpital Bichat – Claude-Bernard

Stages niveau 1

4^{ème} semestre : Virologie – Bactériologie, Pr. Rozenberg et Pr. Poyart, hôpital Cochin

3^{ème} semestre : Parasitologie – Mycologie, Pr. Le Bras, hôpital Bichat – Claude-Bernard

2^{ème} semestre : Biochimie, Pr. Beaune, hôpital Georges Pompidou

1^{er} semestre : Hématologie, Pr. Guillin, hôpital Bichat – Claude-Bernard

2002-2008 - Premier et deuxième cycle d'études médicales : UPMC Paris VI – Saint Antoine :

2008 - Examen National Classant : rang 1767. Choix de spécialisation : Biologie Médicale

2008 - Obtention du Certificat de synthèse clinique et thérapeutique

2003 - Concours d'admission en 2^{ème} année de médecine : classé 123^{ème}

Formation scientifique

■ Janvier 2017-en cours - Doctorat Sciences de La vie et de la Santé – Ecole Doctorale Galilée Paris 13 – Laboratoire LVTS Unité INSERM 1148 (Didier Letourneur). « Nouvelles technologies pour la congélation de cortex ovarien : mise au point et application chez la souris » sous la direction des Pr. Anne Meddahi-Pellé et Pr. Catherine Patrat.

■ 2013 - Master 2 Professionnel mention « Biologie Cellulaire, Physiologie et pathologie » spécialité « Biologie de la Reproduction humaine et assistance à la Procréation » (Université Paris V) : réalisation d'un mémoire : « Existe-t-il des facteurs prédictifs de la détection d'ARN VHI-1 dans le plasma séminal de patients sous trithérapie avec une charge virale sanguine indétectable » sous la direction du Pr. Patrat (hôpital Bichat). Mention Bien.

■ 2012 - Master 2 Recherche mention « Biologie Cellulaire, Physiologie et pathologie » spécialité « Reproduction et Développement » (Université Paris Diderot), mention Bien :

- Stage de recherche à l'INSERM U698 hôpital Bichat, équipe « bioengineering for cardiovascular imaging and therapy » (Didier Letourneur).
- Rédaction d'un mémoire sur de « Nouveaux systèmes pour la congélation lente d'ovocytes » sous la direction du Pr.
 Catherine Patrat (hôpital Bichat Claude-Bernard) et du Pr. Anne Meddahi-Pellé (INSERM U698).

■ 2011 - UE 7 « Physiologie de la reproduction » et UE8 « Les interventions biomédicales dans la reproduction et la physiologie de la reproduction » du Master 1 Santé « Sciences de la vie et de la santé » mention « Biologie Cellulaire, Physiologie et pathologies ».

■ 2004-2005 - Maîtrise de sciences biologiques et médicales Paris VI :

- Certificat d'« Informatique médicale et technologies de communication ».
- Certificat de « Méthodologie de la recherche clinique et Epidémiologie ».

2002 - Baccalauréat scientifique option Physique Chimie, mention Bien.

Publications et Communications à des congrès

Publications

Commissaire M, Epelboin S, Vigan M, Tubiana S, Llabador MA, Gauché-Cazalis C, Gricourt S, <u>Ferraretto X</u>, Peigné M. **Serum** progesterone level and ongoing pregnancy rate following frozen-thawed embryo transfer after artificial endometrial preparation: a monocentric retrospective study. J Gynecol Obstet Hum Reprod. 2020 ; 10:101828.

Hercent A, Amar E, Valent A, Belloc S, <u>Ferraretto X</u>, Hermieu JF, Battin-Bertho R, Storey C, Goubin-Versini I, Dijoud F, Tabet AC, Chantot-Bastaraud S, Peycelon M, Morel H, Siffroi JP. Various genital and reproductive phenotypes in 46,XX/46,XY Chimeras. Sex Dev. 2019 ; 13 : 271-277

Peigné M, Devouche E, <u>Ferraretto X</u>, Gricourt S, Luton D, Patrat C, Epelboin S. **Higher live birth rate with stimulated rather than** artificial cycle for frozen-thawed embryo transfer. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2019 ; 243 : 144-149

Ninive C, <u>Ferraretto X</u>, Gricourt S, Llabador MA, Lepage J, Gauché-Cazalis C, Sylvie Epelboin, Peigné M. Assisted reproductive technologies in HIV patients: Which results and which strategy in France in 2019 ? Gynecol Obstet Fertil Senol. 2019 ; 47 : 362-369

Pereira J, <u>Ferraretto X</u>, Patrat C, Meddahi-Pellé A. Dextran-based hydrogel as a new tool for Balb/c 3T3 cells cryopreservation without DMSO. Biopreserv Biobank. 2019 ; 17 : 2-10

<u>Ferraretto X</u>, Gille AS, Ferreux L, Dulioust E. **Pourquoi, quand et comment utiliser le sperme frais d'un homme séropositif pour** le virus de l'immunodéficience humaine ? Médecine de la Reproduction 2018 ; 20 (2) : 109-17

Lemoine M, Ferraretto X, Llabador MA, Benammar A, Darolles J, Epelboin S, Eustache F, Patrat C. Sperm concentration measurement with a Kova counting chamber. Asian J Androl. 2018; 20: 525-526

Ferraretto X, Estellat C, Damond F, Longuet P, Epelboin S, Demailly P, Yazbeck C, Llabador MA, Pasquet B, Yazdanpanah Y, Matheron S, Patrat C. Timing of intermittent seminal HIV-1 RNA shedding in patients with undetectable plasma viral load under combination antiretroviral therapy. PLoS One 2014; 9 (3): e88922

Ouvrage scientifique

Infertilité, prise en charge globale et thérapeutique (Pr René Fridman). Participation à la rédaction du chapitre « Prise en charge en assistance médicale à la procréation pour les couples sérodiscordants ». CNGOF - Elsevier Masson, 2016.

Communications orales

Chaput L, <u>Ferraretto X</u>, Ferreux L, Naam-Ouarezki R, Patrat C, Maitre JL. **Quantitative analysis of compaction in human** preimplantation embryos with time-lapse imaging andexamination of its relevance to implantation. European Society of Human Reproduction and Embryology Congress (ESHRE), 2019.

Naam-Ouarezki R, <u>Ferraretto X</u>, Vigan M, Lousqui J, Llabador MA, Peigné M, Tubiana S, Epelboin S, Patrat C. Is there a relation between embryo early cleavage abnormalities and blastulation or implantation rates? A retrospective time-lapse imaging study. European Society of Human Reproduction and Embryology Congress (ESHRE), 2018.

Epelboin S, <u>Ferraretto X</u>, Devouche E, Gricourt S, Gauche-Cazalis C, Lepage J, Patrat C, Luton D, Peigné M. Live birth rate after frozen-thawed embryo transfer according to endometrial preparation: mild gonadotropin ovarian stimulation leads to increased success compared to artificial cycle. European Society of Human Reproduction and Embryology Congress (ESHRE), 2018.

Benammar A, <u>Ferraretto X</u>, Galati E, Llabador MA, Gricourt S, Epelboin S, Yazbeck C, Patrat C. Different thawed cleaved embryo transfer strategy for cryopreserved embryos according to modeof cryopreservation? : a prospective randomized study comparing 2 culture medium duration. European Society of Human Reproduction and Embryology Congress (ESHRE), 2016.

<u>Ferraretto X.</u> Prix du Master 2 professionnel. **Existe-t-il des facteurs prédictifs de la détection d'ARN VHI-1 dans le plasma** séminal de patients sous trithérapie avec une charge virale sanguine indétectable. Congrès de la Société d'Andrologie de Langue Française (SALF), 2014.

Communications affichées

<u>Ferraretto X</u>, Hermieu JF, Llabador MA, Amar E, Hercent A, Siffroi JP. **Testicular sperm extraction (TESE) and genetic analysis** feedback in a non-obstructive azoospermic man presenting a 46,XY/46,XX constitutional chimerism. European Society of Human Reproduction and Embryology Congress (ESHRE), 2020. Commissaire M, Epelboin S, Vigan S, Tubiana S, Llabador MA, Gauché-Cazalis C, Gricourt S, <u>Ferraretto X</u>, Peigné M. Serum progesterone level and ongoing pregnancy rate following frozen-thawed embryo transfer (FET) after hormone replacement therapy (HRT): a monocentric retrospective cohort study. European Society of Human Reproduction and Embryology Congress (ESHRE), 2019.

Epelboin S, Devouche E, <u>Ferraretto X</u>, Gricourt S, Lepage J, Gauche-Cazalis C, Luton D, Patrat C, Peigné M. Influence de la préparation endométriale sur le poids de naissance des enfants nés après transferts d'embryons congelés : même risque de macrosomie entre cycles stimulés ou substitués ? Congrès Fédération Française d'Etudes sur la Reproduction (FFER), 2018.

Peigné M, Devouche E, <u>Ferraretto X</u>, Commissaire M, Gauche-Cazalis C, Gricourt S, Lepage J, Luton D, Patrat C, Epelboin S. Le taux de grossesse évolutive après transfert d'embryons congelés (TEC) est supérieur en cycle naturel ou stimulé comparé au cycle artificiel. Congrès Fédération Française d'Etudes sur la Reproduction (FFER), 2017.

Llabador MA, Chargui A, Hurtado-Nedelc MM, Benammar A, <u>Ferraretto X</u>, Gauché-Cazalis C, Gricourt S, Epelboin S, Patrat C. **IMSI** (Intracytoplasmic Morphologically Selected-sperm Injection) versus conventional IVF (In VitroFertilization): a randomized prospective study about the management of the idiopathic infertility. European Society of Human Reproduction and Embryology Congress (ESHRE), 2016.

<u>Ferraretto X</u>, Estellat C, Damond F, Epelboin S, Demailly P, Yazbeck Y, Llabador MA, Pasquet M, Matheron S, Patrat C. Very short delay of intermittent HIV-1 RNA excretion in seminal plasma samples from HAART-treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma. European Society of Human Reproduction and Embryology Congress (ESHRE), 2013.

<u>Ferraretto X</u>, Estellat C, Damond F, Epelboin S, Demailly P, Yazbeck C, Llabador MA, Pasquet B, Matheron S, Patrat C. Facteurs prédictifs de la détection d'ARN VHI-1 dans le plasma séminal de patients sous trithérapie avec une charge virale sanguine indétectable. Congrès Fédération Française d'Etudes sur la Reproduction (FFER), 2012.

Activité d'enseignement

■ 2017 : Encadrement et direction de la thèse d'exercice de médecine et du master 2 professionnel «Biologie de la Reproduction humaine et assistance à la Procréation » de Roussila Naam-Ouarezki : « Is there a relation between embryo early cleavage abnormalities and embryo development, implantation and characteristics of patients? a retrospective time-lapse imaging study ».

■ 2016 : Encadrement et direction de la thèse d'exercice de médecine de Marine Anselmo : « Impact de l'infection chronique par le virus de l'Hépatite B sur la fertilité masculine : Etude comparée d'une prise en charge en FIV et en ICSI de couples suivis à l'Hôpital Bichat - Claude-Bernard (AP-HP) ».

■ 2015-2019 : Enseignements dirigés d'Histologie et Embryologie à la faculté de Médecine Paris VII : PACES, 64 heures par année.

Activité extra-hopitalière

Membre du Comité Médical et Scientifique de l'Agence de la Biomédecine (ABM)

Membre de la Société de Médecine de la Reproduction (SMR)

Membre des Biologistes des Laboratoires d'Etude de la Fécondation et de la Conservation de l'œuf (BLEFCO)

Membre du groupe des utilisateurs français de l'Embryoscope[®]

Autres

- Maitrise des outils informatiques : Word, Excel, PowerPoint, MédiFirst et Photoshop
- Maitrise des langages de programmation orientés web : HTML, PHP, SQL, CSS et JavaScript
- Langues : Anglais oral et écrit, Espagnol oral et notions d'Italien
- Centres d'intérêts : cinéma, photographie

le 10/11/2020 ID 11/2020 DEPARTEMENT - HISTOLOGIE -BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION Dr Xavier ITER ARETTO CHU Bichai - No. Komand 46, rue Henri Huchard - 7580 Paris cedex 18 Tél.: 01:40:25:88:04 Fax: 01:40:25:87:97 UA3111

Commissaire M, Epelboin S, Vigan M, Tubiana S, Llabador MA, Gauché-Cazalis C, Gricourt S, <u>Ferraretto X</u>, Peigné M. Serum progesterone level and ongoing pregnancy rate following frozenthawed embryo transfer after artificial endometrial preparation: a monocentric retrospective study. J Gynecol Obstet Hum Reprod. 2020 ; 10:101828.

Hercent A, Amar E, Valent A, Belloc S, <u>Ferraretto X</u>, Hermieu JF, Battin-Bertho R, Storey C, Goubin-Versini I, Dijoud F, Tabet AC, Chantot-Bastaraud S, Peycelon M, Morel H, Siffroi JP. **Various genital and reproductive phenotypes in 46,XX/46,XY Chimeras. Sex Dev. 2019 ; 13 : 271-277**

Peigné M, Devouche E, <u>Ferraretto X</u>, Gricourt S, Luton D, Patrat C, Epelboin S. **Higher live birth rate** with stimulated rather than artificial cycle for frozen-thawed embryo transfer. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2019; 243 : 144-149

Ninive C, <u>Ferraretto X</u>, Gricourt S, Llabador MA, Lepage J, Gauché-Cazalis C, Sylvie Epelboin, Peigné M. Assisted reproductive technologies in HIV patients: Which results and which strategy in France in 2019 ? Gynecol Obstet Fertil Senol. 2019 ; 47 : 362-369

Pereira J, <u>Ferraretto X</u>, Patrat C, Meddahi-Pellé A. **Dextran-based hydrogel as a new tool for Balb/c 3T3 cells cryopreservation without DMSO**. **Biopreserv Biobank. 2019 ; 17 : 2-10**

<u>Ferraretto X</u>, Gille AS, Ferreux L, Dulioust E. **Pourquoi, quand et comment utiliser le sperme frais** d'un homme séropositif pour le virus de l'immunodéficience humaine ? Médecine de la Reproduction 2018 ; 20 (2) : 109-17

Lemoine M, <u>Ferraretto X</u>, Llabador MA, Benammar A, Darolles J, Epelboin S, Eustache F, Patrat C. Sperm concentration measurement with a Kova counting chamber. Asian J Androl. 2018 ; 20 : 525-526

Formation disciplinaires				
Date(s)	Evénement(s)	Nombre(s)		
21/09/2017 23/09/2016	21 èmes journées de la Fédération française d'Etude de la Reproduction FFER	18		
14/06/2017 14/06/2017	Actualité en gynécologie Obstétrique et Reproduction	6		
02/07/2017 05/07/2017	European Society of Humain Reproduction and Embryologie Congres ESHRE	24		
25/09/2019 27/09/2019	24èmes journées de la Fédération Française d'Etude de la Reproduction FFER	18		
Nombre total :		66		
Formation disciplinaires :		66		
	Participation à des conférences/colloques en France	42		
	Participation à des conférences/colloques international	24		
Nombre total du livret :		66		

Résumé :

La préservation de la fertilité dans le contexte oncologique pour les femmes prépubères repose actuellement sur la congélation lente de cortex ovarien d'après les recommandations en vigueur. Elle a pour objectif de préserver les follicules primordiaux qui constituent la réserve ovarienne de ces patientes. Bien que cette technique ait permis d'obtenir des naissances vivantes lorsqu'elle est effectuée chez des femmes pubères, elle semble encore perfectible en termes de surie des follicules primordiaux. De plus, elle repose sur l'utilisation de cryoprotecteurs pénétrants comme le diméthyl sulfoxide (DMSO) qui sont potentiellement cytotoxiques. Les polysaccharides naturels comme le dextrane ont démontré leur capacité cryoprotectrice. Ils peuvent être réticulés sous forme d'hydrogels qui possèdent des capacités physicochimiques les rendant possiblement intéressants pour une utilisation en congélation. Nous avons mis au point un hydrogel à base de dextrane de 500KDa, le PSH₅₀₀, utilisable directement en solution. L'objectif de ce travail était d'adapté le PSH₅₀₀ à la congélation lente d'ovaires de souris. Dans une première partie nous avons démontré l'absence de cytotoxicité de l'hydrogel, établir ses caractéristiques physicochimiques et démontrer sa capacité cryoprotectrice dans la congélation lente de fibroblastes de souris en absence de DMSO. Nous avons ensuite utilisé le PSH₅₀₀ seul ou associé à 0,5M de DMSO (PSH₅₀₀+DMSO) en congélation lente d'ovaires de souris. Les ovaires congelés avec l'association PSH₅₀₀+DMSO ont montré une survie folliculaire, notamment des follicules primordiaux, comparable à la solution de référence (Ref) qui possède trois fois plus de DMSO (1,5M). Enfin, nous avons mis au point un modèle de greffe hétérotopique d'ovaires chez la souris après avoir congelé ces derniers avec les solutions Ref et PSH₅₀₀+DMSO. Les premières analyses à 7 jours post greffe ont objectivé la présence de follicules primordiaux et primaires intacts dans le groupe PSH₅₀₀+DMSO. Le PSH₅₀₀ semble être un dispositif non cytotoxique et simple d'utilisation, prometteur dans le cadre d'une utilisation en congélation de cortex ovarien. Ce travail est une première étape importante avant une potentielle utilisation du PSH₅₀₀ en clinique humaine dans cette indication.

Mots clefs : préservation de la fertilité, cortex ovarien, cryoprotecteur, dextrane, hydrogel

Abstract:

Fertility preservation in the oncological context for prepubertal women is based on the slow freezing of the ovarian cortex according to current recommendations. Its aim is to preserve the primordial follicles which constitute the ovarian reserve of these patients. Although this technique has been successful in achieving live births when carried out in pubescent women, it still appears to be perfectible. Furthermore, it is based on the use of penetrating cryoprotectants such as dimethylsulfoxide (DMSO) which are potentially cytotoxic. Natural polysaccharides such as dextran have already demonstrated their cryoprotective capacity. They can be crosslinked in the form of hydrogels which possess physicochemical capacities that could make them all the more interesting for use in freezing. We have developed a 500KDa dextran-based hydrogel, the PSH₅₀₀, which can be used directly in solution. The aim of this work was to adapt the PS_{H500} to the slow freezing of mouse ovaries. In a first part we were able to demonstrate its absence of cytotoxicity, establish its physicochemical characteristics and demonstrate its cryoprotective capacity in the slow freezing of mouse fibroblasts in the absence of DMSO. Then we used PSH₅₀₀ alone or in combination with 0.5M DMSO (PSH₅₀₀+DMSO) in the slow freezing of mouse ovaries. The ovaries frozen with the PSH₅₀₀+DMSO combination showed follicular survival, particularly of the primordial follicles, comparable to the reference solution (Ref) which had three times more DMSO (1.5M). Finally, we developed a heterotopic ovary graft model in mice after freezing them with the Ref and PSH₅₀₀+DMSO solutions. The first analyses at 7 days post-transplant showed the presence of intact primordial and primary follicles in the PSH₅₀₀+DMSO group. The PSH₅₀₀ appears to be a promising non-cytotoxic and simple to use device for use in ovarian cortex freezing. This work is an important first step towards potential clinical use in humans of the PSH₅₀₀ in this indication.

Key words: fertility preservation, ovarian cortex, cryoprotectant, dextran, hydrogel