

COMMUNICATION

Cryopréservation du tissu testiculaire chez l'enfant

MOTS-CLÉS : TUMEURS. ENFANT. PRÉSERVATION DE LA FERTILITÉ. TUMEURS DU TESTICULE

Cryopreservation of testicular tissue in children

KEY-WORDS (Index medicus): NEOPLASMS. CHILD. FERTILITY PRESERVATION. TESTICULAR NEOPLASMS

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

Nathalie RIVES *, Jean-Pierre MILAZZO *, Albanne TRAVERS *, Brahim ARKOUN *, Amandine BIRONNEAU *, Louis SIBERT **, Agnès LIARD-ZMUDA ***, Aude MARIE-CARDINE ****, Pascale SCHNEIDER ****, Jean-Pierre VANNIER ****, Bertrand MACÉ *

RÉSUMÉ

Les traitements du cancer ont une toxicité qui peut atteindre tous les organes ou tissus avec comme conséquence des séquelles retentissant sur la qualité de vie des patients après guérison. La cellule germinale souche ou spermatogonie souche constitue une cible de choix de cette toxicité avec un risque de stérilité qui est dépendant des schémas thérapeutiques utilisés. Chez l'enfant, la congélation du tissu testiculaire est un procédé récent et potentiel de préservation de la fertilité masculine. Cependant, les modalités d'utilisation du tissu testiculaire congelé doivent encore être développées chez l'homme bien que largement étudiées dans différentes espèces animales.

* Laboratoire de Biologie de la Reproduction — CECOS, EA 4308 « Gamétogenèse et Qualité du Gamète », IRIB, CHU-Hôpitaux de Rouen — CHU Charles Nicolle ; Université de Rouen.

** Urologie, EA 4308 « Gamétogenèse et Qualité du Gamète », IRIB, CHU-Hôpitaux de Rouen — CHU Charles Nicolle ; Université de Rouen.

*** Chirurgie infantile, CHU-Hôpitaux de Rouen — CHU Charles Nicolle ; Université de Rouen.

**** Immuno-Hémato-Oncologie pédiatrique, CHU-Hôpitaux de Rouen — CHU Charles Nicolle ; Université de Rouen.

Tirés à part : Professeur Nathalie RIVES, Laboratoire de Biologie de la Reproduction — CECOS, CHU-Hôpitaux de Rouen — CHU Charles Nicolle, 1 rue de Germont — 76031 Rouen Cedex

Article reçu le 17 avril 2013, accepté le 27 mai 2013

SUMMARY

The toxicity of cancer therapies can affect all organs and tissues. Some treatments damage spermatogonial stem cells (SSCs), with a risk of infertility. Storage and reimplantation of frozen testicular tissue is a recent approach to fertility preservation for young boys. However, thawed frozen prepubertal testicular tissue must undergo a maturation process to restore sperm production. This process, currently being studied in animal models, can be achieved by in vivo transplantation of SSCs into seminiferous tubules or by testicular grafting, possibly following in vitro maturation.

INTRODUCTION

Les cancers de l'enfant représentent moins de 1 % de l'ensemble des cancers mais constituent, avant l'âge de 15 ans, la première cause de décès par maladie [1]. Ainsi, chez les enfants âgés de 0 à 14 ans, environ 1 500 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année en France [2]. La répartition en fonction du sexe met en évidence une prévalence masculine avec un rapport garçons/filles estimé à 1/1,2. Les nouveaux cas observés sont en plus forte proportion dans le groupe d'âge des 0-4 ans avec une fréquence de 36 % suivi par le groupe des 15-19 ans avec une fréquence de 28 % [1-3].

Les cancers de l'enfant diffèrent de ceux de l'adulte par leurs types histologiques, leur chimiosensibilité, leur pronostic et leur évolution. Les tumeurs solides ainsi que les hémopathies malignes sont les cancers les plus fréquemment retrouvés chez l'enfant [2, 4-5]. La survie des enfants après traitement d'un cancer a subi une importante amélioration au cours des trente dernières années du fait des progrès réalisés dans le diagnostic et les thérapeutiques utilisées, transformant ainsi une maladie fatale en maladie curable pour bon nombre des enfants atteints. En Europe et en Amérique du Nord, ce taux de guérison était de 25-30 % en 1970 et a atteint 70-80 % en 2001 [6-7].

Les traitements du cancer ont une toxicité reconnue qui peut atteindre tous les organes ou tissus avec comme conséquences des séquelles pouvant retentir sur la qualité de vie des patients après guérison. Les gonades constituent une cible de choix de cette toxicité, le testicule étant plus vulnérable que l'ovaire. Le testicule peut être atteint à la fois au niveau de sa fonction exocrine, la spermatogenèse (cellules germinales et cellules de Sertoli) et de manière plus exceptionnelle au niveau de sa fonction endocrine (cellules de Leydig). En effet, l'épithélium séminifère et plus spécifiquement la cellule germinale souche sont particulièrement sensibles aux effets toxiques de la chimiothérapie ou la radiothérapie, la cellule de Leydig étant beaucoup plus résistante et la toxicité sur la cellule de Sertoli étant plus difficilement évaluable. Cependant, cette toxicité gonadique sera dépendante des thérapeutiques mises en œuvre [type (radiothérapie, chimiothérapie), dose, durée]. En ce qui concerne la radiothérapie, la dose totale d'irradiation reçue, son caractère fractionné ou non ainsi que le champ d'irradiation sont des paramètres à prendre en

considération pour l'évaluation de la toxicité du traitement. En ce qui concerne la chimiothérapie, les molécules utilisées, la dose cumulée du principe actif reçu et la combinaison des molécules doivent également être retenues. Ainsi, les agents alkylants mais aussi les antimétabolites sont connus pour leur effet toxique à long terme ou permanent sur les cellules germinales souches. Enfin, l'âge du patient, la susceptibilité individuelle à la toxicité de ces traitements et la qualité de la spermatogenèse préalable à l'introduction des traitements sont également des paramètres à prendre en considération [8-9].

Cependant, certains schémas thérapeutiques sont à risque très élevé d'altération définitive de la cellule germinale souche : (i) le conditionnement précédant l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) (irradiation corporelle totale et chimiothérapie aplasante) ; (ii) l'intensification thérapeutique avec autogreffe de CSH (incluant le support de cellules souches hématopoïétiques) ; (iii) les traitements utilisés pour les tumeurs des tissus mous métastatiques et des protocoles de chimiothérapie pouvant inclure l'utilisation d'agents alkylants pour traiter certains lymphomes ; (iv) la radiothérapie pelvienne ou testiculaire [10]. En Europe, le nombre de greffes de CSH réalisées chez l'enfant atteint d'un cancer a augmenté de manière conséquente depuis 1996 [11]. En France, les greffes de CSH pratiquées chez le garçon représentent près de 59 % de l'ensemble des allo- et autogreffes effectuées chez l'enfant dont l'âge est compris entre 0 et 16 ans [12].

Le testicule prépubère n'est pas protégé des effets toxiques de la chimiothérapie ou de la radiothérapie, en dépit d'un faible taux de prolifération cellulaire observé au niveau des spermatogonies. Ainsi, une azoospermie peut être observée chez près de 18 % des hommes guéris d'un cancer traité durant l'enfance [13]. Des stratégies pour préserver leur fertilité doivent être proposées et plus particulièrement si un traitement à risque majeur d'altération définitive de la cellule germinale souche est envisagée.

QUELLES SONT LES STRATÉGIES DE PRÉSERVATION DE LA FERTILITÉ CHEZ LE GARÇON ?

La préservation de la fertilité est actuellement envisageable pour les hommes pubères et pour les femmes pubères ou prépubères. Chez la petite fille, l'adolescente et la jeune femme, la congélation du tissu ovarien peut être proposée afin de préserver leur fertilité. La congélation d'embryons est proposée dans des indications très limitées chez des femmes faisant partie d'un couple avec un projet parental déjà établi. La congélation d'ovocytes tend à se développer dans des indications très ciblées. La conservation du tissu ovarien permet actuellement d'envisager une greffe autologue après guérison. À ce jour, des essais de greffe ont été réalisés pour environ une trentaine de patientes dans le monde. Des naissances ont ainsi été obtenues après restauration naturelle de la fertilité [14]. Chez les hommes pubères, la congélation des spermatozoïdes est proposée depuis les années 1970 en France en vue

d'une utilisation ultérieure dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation (AMP) [15, 16].

Chez le garçon prépubère, la préservation de la fertilité repose uniquement sur la possibilité de conserver les cellules germinales souches. Aucune autre stratégie de préservation de la gonade n'est actuellement disponible. Par exemple, aucun traitement médical de protection des cellules germinales souches et plus largement de la gonade n'est actuellement disponible [17-18].

La conservation par congélation des cellules germinales souches peut s'envisager selon différentes modalités. Un prélèvement chirurgical de tissu testiculaire doit tout d'abord être effectué. Puis, le tissu testiculaire ainsi prélevé sera utilisé sous la forme de fragments ou d'une suspension de cellules testiculaires ou d'une fraction enrichie en cellules germinales souches obtenue après dissociation mécanique ou enzymatique du tissu. Les fragments de tissu testiculaire ou la suspension cellulaire pourront avant ou après congélation être : (i) mis en culture de façon à reproduire *in vitro* une spermatogenèse (maturation *in vitro*) — les spermatozoïdes ainsi générés seront congelés en vue d'une utilisation ultérieure dans le cadre d'une AMP [19] ; (ii) greffés ou transplantés chez le patient après guérison afin d'obtenir une spermatogenèse *in vivo* (maturation *in vivo*) chez le patient pour restaurer sa fertilité naturelle ou pour produire des spermatozoïdes utilisables dans le cadre d'une AMP ; (iii) greffés ou transplantés chez l'animal (xénogreffe ou xénotransplantation) afin d'aboutir aussi à une spermatogenèse *in vivo* [20].

Les maturations *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal sont envisageables dans la situation de tumeurs pouvant métastaser et envahir le tissu testiculaire. Tout risque de réintroduction de cellules néoplasiques au patient serait ainsi évité. Les maturations *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal présentent néanmoins un certain nombre d'inconvénients. Tout d'abord, dans la mesure où la maturation des gamètes se ferait dans un environnement différent de celui d'origine, on peut craindre des modifications d'ordre génétique ou épigénétique pouvant être à l'origine de pathologies de la descendance. Une contamination par des agents infectieux d'origine animale est également possible en maturation *in vivo* chez l'animal ou en maturation *in vitro*, si des cellules ou des molécules d'origine animale sont utilisées. Enfin, on peut s'interroger s'il est acceptable sur le plan éthique d'utiliser en AMP des spermatozoïdes humains obtenus chez un animal. Ces différents inconvénients ne sont pas retrouvés dans le cas d'une maturation *in vivo* chez le patient. De plus, la transplantation de cellules germinales souches dans les testicules du patient guéri, est la seule approche permettant d'envisager une restauration naturelle de la fertilité [20]. Cependant, le risque de réintroduction de la maladie existe à la fois dans le cas d'une greffe autologue de tissu testiculaire ou d'une transplantation de cellules testiculaires.

La congélation et la conservation de fragments de tissu testiculaire permet donc d'envisager les différentes modalités d'utilisation mentionnées ci-dessus. Elle permet également de préserver l'architecture des tubes séminifères et plus spécifiquement le microenvironnement propre à la niche de la cellule germinale souche.

COMMENT CONGELER LE TISSU TESTICULAIRE OU LES CELLULES GERMINALES SOUCHES ?

La conservation de cellules ou de tissus par congélation a pour but de suspendre l'état de vie et d'animation des cellules à des températures cryogéniques (-196° C). Tout procédé de congélation cellulaire ou tissulaire comprend des étapes successives de mise en œuvre dont la chronologie et le contrôle doivent être précis. En effet, la viabilité cellulaire et la qualité de la matrice extracellulaire après décongélation seront influencées par le degré de déshydratation des cellules, la cristallisation et la toxicité des cryoprotecteurs utilisés. Le procédé de congélation comprendra donc : (i) l'équilibration de l'échantillon avec le milieu de congélation contenant les cryoprotecteurs ; (ii) la descente en température ; (iii) la conservation à basse température ; (iv) la décongélation permettant l'élimination des cryoprotecteurs utilisés [21-24].

Le tissu testiculaire prépubère est constitué de cellules riches en cytoplasme (cellules germinales souches, cellules de Sertoli et cellules de Leydig) avec un risque accru de formation de cristaux de glace dans le cytoplasme de ces cellules lors de la congélation : les milieux de congélation, les protocoles de congélation et la courbe de descente en température contrôlée et rapide utilisés pour les spermatozoïdes, cellules pauvres en cytoplasme mais dont la congélation est maîtrisée depuis 1953, ne sont pas adaptés pour le tissu testiculaire prépubère [25-26]. En revanche, les protocoles de congélation utilisés pour la congélation des embryons ou du tissu ovarien humain semblent plus adaptés pour la congélation du tissu testiculaire prépubère [28]. Ainsi, le développement d'un protocole de congélation de tissu testiculaire prépubère ou de cellules germinales souches nécessite la maîtrise de nombreux paramètres avec la nécessité de développer des modèles animaux avant d'envisager une utilisation chez l'enfant dans le cadre de la préservation de la fertilité.

Différents cryoprotecteurs ont été utilisés pour la congélation de cellules testiculaires ou de tissu testiculaire : le diméthylsulfoxyde pour la congélation de spermatogonies isolées de testicules pubères ou prépubères de souris [29] ou humaines [30] avec une efficacité plus importante que le glycérol dans le maintien de la viabilité post-décongélation des spermatogonies A bovines [31] et que l'éthylène glycol lors de la congélation de spermatogonies isolées de testicules prépubères de souris [32]. L'ajout de sucrose semble accroître l'effet cryoprotecteur du milieu sur les cellules germinales [31-32]. Les meilleures viabilités obtenues après décongélation sont obtenues avec des courbes de descente en température non linéaires et contrôlées avec « seeding » généralement entre -6 et -7° C [30, 33-34]. Les spermatogonies murines [34] ou bovines [31] conservent une viabilité satisfaisante après une descente en température non contrôlée en plaçant directement les échantillons à -80° C pendant 24 heures avant de les plonger dans l'azote liquide. La vitrification d'une fraction enrichie en cellules diploïdes testiculaires humaines permet d'obtenir une bonne viabilité après décongélation [35].

La congélation du tissu testiculaire permet de conserver par congélation un ou plusieurs fragments de testicule issus d'un ou deux testicules. Le diméthylsulfoxyde, l'éthylène glycol, le glycérol ou le propanediol sont des cryoprotecteurs qui ont été utilisés pour la congélation du tissu testiculaire chez le rongeur, le primate non humain, le porc et l'homme [23]. La courbe de descente en température peut être lente contrôlée ou non, avec ou sans seeding [20, 23, 36-37]. Les meilleurs résultats étaient généralement obtenus en utilisant du DMSO à une concentration de 0,7 ou 1,5M en réalisant une descente en température lente de façon contrôlée ou non contrôlée, avec ou sans seeding [20, 37].

La congélation du tissu testiculaire a été rapportée plus récemment chez l'enfant ou l'adolescent selon une courbe de descente en température lente avec ou sans seeding. Bahadur *et al.* [38] réalisent un prélèvement testiculaire chez deux garçons âgés respectivement de 8 et 13 ans avant l'introduction d'un traitement par chimiothérapie en utilisant un protocole de congélation de spermatozoïdes, aucune précision n'est apportée sur la qualité du tissu après décongélation. Keros *et al.* [39] congèlent des fragments testiculaires prélevés chez cinq garçons âgés entre 2 et 14 ans avant traitement à risque élevé de stérilité, chimiothérapie et irradiation pelvienne pour l'un d'entre eux et allogreffe de cellules souches hématopoïétiques pour les quatre autres enfants. Les cellules germinales souches sont évaluées sur le plan quantitatif et qualitatif après décongélation. Cependant, les données rapportées ne permettent pas de préciser si ces cellules sont présentes et fonctionnelles chez tous les patients. Kvist *et al.* [40] rapporte la congélation de tissu testiculaire chez de jeunes garçons devant subir une cure chirurgicale de cryptorchidie. Enfin, très récemment, la conservation du tissu testiculaire a été rapportée dans le cadre de la préservation de la fertilité dans et en dehors du champ du cancer chez le garçon pré-pubère voire le jeune adolescent (n = 5 [40] ; n = 16 [41] ; n = 62 [43]). La vitrification du tissu testiculaire humain pré-pubère a été rapportée de manière plus exceptionnelle [43].

En France, la congélation du tissu testiculaire s'inscrit dans la loi relative à la bioéthique de Juillet 2011 qui reconnaît que « toute personne peut bénéficier du recueil et de la conservation de ses gamètes ou de son tissu germinal... lorsqu'une prise en charge médicale est susceptible d'altérer sa fertilité, ou lorsque sa fertilité risque d'être prématurément altérée ». Cependant, cette procédure de préservation de la fertilité masculine se met en place lentement en France et en Europe, du fait de la nécessité de maîtriser la procédure de congélation du tissu testiculaire mais aussi de pouvoir mettre en place un réseau pluridisciplinaire associant les onco-hématologues de l'enfant, les chirurgiens infantiles et les médecins et biologistes de la reproduction pour assurer une prise en charge optimale des jeunes patients.

La congélation du tissu testiculaire est proposée aux garçons (enfants, adolescents et adultes jeunes) depuis l'année 2007 au sein de notre centre de préservation de la fertilité [Centre d'Étude et de Conservation des Œufs et du sperme humain (CECOS) du CHU — Hôpitaux de Rouen]. Près de 80 patients ont pu bénéficier de cette procédure qui a été réalisée dans 72 % des cas dans le champ du cancer, avant allo- ou autogreffes de cellules souches hématopoïétiques. Environ 12 % des enfants

sont actuellement décédés. L'intégrité structurale du tissu testiculaire est conservée après décongélation. Le prélèvement du tissu testiculaire a été uni ou bilatéral et a été effectué par voie chirurgicale selon une technique standardisée utilisée également chez les hommes infertiles présentant une azoospermie non obstructive en vue d'isolement de spermatozoïdes [22].

Chez le garçon pré-pubère, la congélation du tissu testiculaire s'adresse à des garçons traités par chimiothérapie ou radiothérapie à fort potentiel stérilisant à l'âge adulte, tel que cela a été défini précédemment. Cette procédure de congélation de tissu testiculaire est également envisageable dans les indications d'orchidectomie bilatérale ou unilatérale sur testicule unique. Des traitements à fort potentiel stérilisant sont utilisés principalement dans des affections malignes. Cependant, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques peut aussi être envisagées dans des pathologies non malignes [41-42].

La proposition de congélation du tissu testiculaire est discutée de manière collégiale entre le pédiatre onco-hématologue, le chimiothérapeute, le radiothérapeute, le biologiste de la reproduction et le chirurgien. La procédure de congélation du tissu testiculaire et les modalités potentielles d'utilisation sont ensuite expliquées au malade et à ses parents. Le consentement du patient et de ses parents sera alors recueilli.

Aucune utilisation de tissu testiculaire humain décongelé, n'a été rapportée à ce jour car la congélation du tissu testiculaire intéresse principalement de jeunes garçons sans demande d'utilisation du tissu conservé. Cependant, les différentes modalités d'utilisation du tissu testiculaire décongelé mentionnées précédemment ont déjà été validées dans plusieurs espèces animales en ce qui concerne la greffe de tissu testiculaire et la transplantation de cellules germinales et chez la souris pour la spermatogenèse *in vitro* [19-20].

CONCLUSION

La congélation du tissu testiculaire permet d'envisager la préservation de la fertilité de jeunes garçons exposés à un traitement très toxiques pour la cellule germinale souche. L'inégalité d'accès à cette procédure sur le territoire français doit nous encourager à améliorer l'information adressée aux prescripteurs potentiels, aux patients et aux parents. Le suivi des patients est également une des étapes de cette procédure afin d'en améliorer les indications et d'orienter le patient dans ses projets de conception ultérieure. De plus, des travaux de recherche doivent être menés pour s'assurer de la fonctionnalité du tissu testiculaire humain après décongélation à la fois en ce qui concerne la maturation *in vivo* et la maturation *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BELOT A., GROSCLAUDE P., BOSSARD N., JOUGLA E., BENHAMOU E., DELAFOSSE P., *et al.* — Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev. Epidemiol. Santé Publique*, 2008, 56(3), 159-175.
- [2] SOMMELET D., LACOUR B., CLAVEL J. — Epidemiology of childhood cancer. *Bull. Acad. Natl. Med.*, 2003, 187, 711-737.
- [3] DESANDES E., CLAVEL J., BERGER C., BERNARD J.L., BLOUIN P., DE LUMLEY L., *et al.* — Cancer incidence among children in France, 1990-1999. *Pediatr. Blood CMCN*, 2004, 43, 749-757.
- [4] BIRCH J.M., ALSTON R.D., KELSEY A.M., QUINN M.J., BABB P., McNALLY R.J. — Classification and incidence of cancers in adolescents and young adults in England 1979-1997. *Br. J. Cancer*, 2002, 87(11), 1267-1274.
- [5] BIRCH J.M., ALSTON R.D., QUINN M., KELSEY A.M. — Incidence of malignant disease by morphological type, in young persons aged 12-24 years in England, 1979-1997. *Eur. J. Cancer*, 2003, 39(18), 2622-2631.
- [6] BIRCH J.M., MARSDEN H.B., JONES P.H., PEARSON D., BLAIR V. — Improvements in survival from childhood cancer: results of a population based survey over 30 years. *Br. Med. J.*, 1988, 296(6633), 1372-1376.
- [7] MERTENS A.C., YASUI Y., NEGLIA J.P., POTTER J.D., NESBIT M.E. JR., RUCCIONE K., *et al.* — Late mortality experience in five-year survivors of childhood and adolescent cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J. Clin. Oncol.*, 2001, 19(13), 3163-3172.
- [8] BROUGHAM M.F., KELNAR C.J., SHARPE R.M., WALLACE W.H. — Male fertility following childhood cancer: current concepts and future therapies. *Asian J. Androl.*, 2003, 5(4), 325-337.
- [9] OEFFINGER K.C., HUDSON M.M. — Long-term complications following childhood and adolescent cancer: foundations for providing risk-based health care for survivors. *C.A. Cancer J. Clin.*, 2004, 54(4), 208-236.
- [10] WALLACE W.H., ANDERSON R.A., IRVINE D.S. — Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol.*, 2005, 6, 209-218.
- [11] MIANO M., LABOPIN M., HARTMANN O., *et al.* — Paediatric Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: a survey by the paediatric diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 2007, 39(2), 89-99.
- [12] Agence de la Biomédecine, « Assistance Médicale à la Procréation », rapport annuel, 2010. Disponible sur : < www.agence-biomedecine.fr > (consulté le 14 mai 2014).
- [13] ROMERIUS P., STÅHL O., MOËLL C., RELANDER T., CAVALLIN-STÅHL E., WIEBE T., *et al.* — High risk of azoospermia in men treated for childhood cancer. *Int. J. Androl.*, 2011, 34(1), 69-76.
- [14] DONNEZ J., DOLMANS M.M. — Preservation of fertility in females with haematological malignancy. *Br. J. Haematol.*, 2011, 154(2), 175-184.
- [15] MENON S., RIVES N., MOUSSET-SIMEON N., *et al.* — Fertility preservation in adolescent males: experience over 22 years at Rouen University Hospital. *Hum. Reprod.*, 2009, 24(1), 37-44.
- [16] RIVES N., PERDRIX A., HENNEBICQ S., SAÏAS-MAGNAN J., MELIN M.C., BERTHAUT I., *et al.* — The Semen Quality of 1158 Men with Testicular Cancer at the Time of Cryopreservation: Results of the French National CECOS Network. *J. Androl.*, 2012, 33(6), 1394-1401.
- [17] MEISTRICH M.L., SHETTY G. — Suppression of testosterone stimulates recovery of spermatogenesis after cancer treatment. *Int. J. Androl.*, 2003, 26, 141-146 (31).

- [18] THOMSON A.B., CRITCHLEY H.O., WALLACE W.H. — Fertility and progeny. *Eur. J. Cancer*, 2002, 38, 1634-1644.
- [19] REUTER K., SCHLATT S., EHMCKE J., WISTUBA J. — Fact or fiction: In vitro spermatogenesis. *Spermatogenesis*, 2012, 2(4), 245-252.
- [20] GOOSSENS E., VAN SAEN D., TOURNAYE H. — Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: from research to clinic. *Hum. Reprod.*, 2013, 28(4), 897-907.
- [21] RIVES N., MILAZZO J.P., SIBERT L., LIARD-ZMUDA A., TRAVERS A., ARKOUN B., PERDRIX A., et la Fédération Française des CECOS. — Préservation de la fertilité masculine. *Médecine de la Reproduction, Gynécologie, Endocrinologie*, 2012, 14(2), 86-93.
- [22] RIVES N., TRAVERS A., MILAZZO J.P., ARKOUN B., BIRONNEAU A., PERDRIX A., MACÉ B. — Quel avenir pour la cellule germinale souche congelée dans le cadre de la préservation de la fertilité masculine ? *Médecine de la Reproduction, Gynécologie, Endocrinologie*, 2013, 15, 23-29.
- [23] WYNS C., CURABA M., VANABELLE B., VAN LANGENDONCKT A., DONNEZ J. — Options for fertility preservation in prepubertal boys. *Hum. Reprod.*, Update 2010, 16(3), 312-328.
- [24] WOELDERS H., CHAVEIRO A. — Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes. *Cryobiology*, 2004, 49(3), 258-271.
- [25] RIVES N., MACÉ B. — Cryoconservation du tissu testiculaire chez l'enfant : comment préserver la fertilité chez le jeune garçon ? *Andrologie*, 2004, 14, 404-411.
- [26] RIVES N., MILAZZO J.P., VAUDREUIL L., MACÉ B. — Congélation du tissu germinal chez le garçon. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 2005, 33(9), 615-619.
- [27] TESTART J., LASSALLE B., BELAISCH-ALLART J., HAZOUT A., FORMAN R., RAINHORN J.D., et al. — High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil. Steril.*, 1986, 46(2), 268-272.
- [28] GOOK D.A., EDGAR D.H., STERN C. — Cryopreservation of human ovarian tissue. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2004, 113 Suppl 1, S41-44.
- [29] AVARBOCK M.R., BRINSTER C.J., BRINSTER R.L. — Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat. Med.*, 1996, 2(6), 693-696.
- [30] NAGANO M., PATRIZIO P., BRINSTER R.L. — Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertil. Steril.*, 2002, 78(6), 1225-1233.
- [31] IZADYAR F., MATTHIJS-RIJSENBILT J.J., DEN OUDEN K., CREEMERS L.B., WOELDERS H., DE ROOIJ D.G. — Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *J. Androl.*, 2002, 23(4), 537-545.
- [32] FREDERICKX V., MICHIELS A., GOOSSENS E., DE BLOCK G., VAN STEIRTEGHEM A., TOURNAYE H. — Recovery, survival and functional evaluation by transplantation of frozen-thawed mouse germ cells. *Hum. Reprod.*, 2004, 19(4), 948-953.
- [33] OGAWA T., OHMURA M., OHBO K. — The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. *Int. J. Hematol.*, 2005, 82, 381-388.
- [34] KANATSU-SHINOHARA M., Ogonuki N., Inoue K., Ogura A., Toyokuni S., Shinohara T. — Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum. Reprod.*, 2003, 18(12), 2660-2667.
- [35] SÁ R., CREMADES N., MALHEIRO I., SOUSA M. — Cryopreservation of human testicular diploid germ cell suspensions. *Andrologia*, 2012, 44(6), 366-372.
- [36] MILAZZO J.P., VAUDREUIL L., CAULIEZ B., GRUEL E., MASSÉ L., MOUSSET-SIMÉON N., MACÉ B., RIVES N. — Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. *Hum. Reprod.*, 2008, 23(1), 17-28.
- [37] MILAZZO J.P., TRAVERS A., BIRONNEAU A., SAFAF A., GRUEL E., ARNOULT C., MACÉ B., BOYER O., RIVES N. — Rapid screening of cryopreservation protocols for murine prepubertal testicular tissue by histology and PCNA immunostaining. *J. Androl.*, 2010, 31(6), 617-630.

- [38] BAHADUR G., CHATTERJEE R., RALPH D. — Testicular tissue cryopreservation in boys. Ethical and legal issues: Case report. *Hum. Reprod.*, 2000, 15(6), 1416-1420.
- [39] KEROS V., HULTENBY K., BORGSTROM B., FRUDSTROM M., JAHNUKAINEN K., HOVATTA O. — Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in prepubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Hum. Reprod.*, 2007, 22(5), 1384-1395.
- [40] KVIST K., THORUP J., BYSKOV A.G., HOYER P.E., MOLLGARD K., YDING ANDERSEN C. — Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Hum. Reprod.*, 2006, 21(2), 484-491.
- [41] GINSBERG J.P., CARLSON C.A., LIN K., HOBBIIE W.L., WIGO E., WU X., BRINSTER R.L., KOLON T.F. — An experimental protocol for fertility preservation in prepubertal boys recently diagnosed with cancer: a report of acceptability and safety. *Hum. Reprod.*, 2010, 25(1), 37-41.
- [42] WYNS C., CURABA M., PETIT S., VANABELLE B., LAURENT P., WESTE J.F., DONNEZ J. — Management of fertility preservation in prepubertal patients: 5 years' experience at the Catholic University of Louvain. *Hum. Reprod.*, 2011, 26(4), 737-47.
- [43] CURABA M., POELS J., VAN LANGENDONCKT A., DONNEZ J., WYNS C. — Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification? *Fertil. Steril.*, 2011, 95(6), 2123.e9-12.

DISCUSSION

M^{me} Monique ADOLPHE

A-t-on des résultats différents entre la congélation lente et la congélation brutale sur la qualité du tissu ?

Les études portant sur la comparaison entre les résultats comparatifs « congélation lente versus congélation ultra-rapide du tissu testiculaire » sont exceptionnelles à l'heure actuelle sur les modèles animaux et chez l'homme. Aucune étude n'a montré la supériorité de l'une procédure de congélation par rapport et surtout en ce qui concerne la possibilité de générer de manière plus efficace des spermatozoïdes par l'une des deux procédures.

M. Jacques HUREAU

La complexité des manipulations depuis le prélèvement du tissu testiculaire jusqu'à l'implantation de l'œuf après FIV n'est-elle pas susceptible de générer des anomalies génomiques ? Compte-tenu du jeune âge des malades, il ne semble pas qu'il y ait de cas clinique humain. Qu'en est-il chez l'animal ? La réponse est peut-être donnée par la cryopréservation du tissu ovarien qui a permis des grossesses satisfaisantes.

Aucune étude n'a encore évalué sur le plan génétique et épigénétique la qualité du conceptus qui serait obtenu par fécondation *in vitro* à partir de spermatozoïdes issus de la maturation *in vivo* (greffe tissulaire ou cellulaire) ou la maturation *in vitro* du tissu testiculaire prépubère décongelé. Les résultats obtenus à partir des enfants conçus après greffe de tissu ovarien ne permettent de nous éclairer sur cette question dans la mesure où à notre connaissance aucune étude affinée sur le plan génomique ou épigénomique n'a été effectuée chez ces enfants. Il s'agit effectivement des objectifs des futures études.