

COMMUNICATON

Restauration de l'infertilité après congélation de tissu ovarien, données expérimentales

MOTS-CLÉS : PRÉSERVATION DE LA FERTILITÉ. OVAIRE. CRYOCONSERVATION

Restoring fertility with frozen ovarian tissue ; experimental results

KEY-WORDS (Index medicus): FERTILITY PRESERVATION. OVARY. CRYOPRESERVATION

Bruno SALLE *, Jacqueline LORNAGE

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

RÉSUMÉ

Au cours des dernières décennies la médecine et la chirurgie de la reproduction sont rentrées dans une nouvelle ère, celle de la médecine préventive. La congélation ovocytaire sociétale en est l'essence même. La préservation de la fertilité féminine aussi. Plusieurs options sont possible et en cours d'évaluation. L'avenir dira celle qui permettra une prise en charge routinière. Actuellement seule la congélation et la greffe de tissu ovarien semblent être rentrées en phase d'application. Les études animales ont démontré son efficacité en rapportant des gestations et des naissances dans plusieurs espèces. Ces études ont montré que la congélation lente ou rapide (vitrification) permettait un taux de survie des follicules primordiaux après réchauffement de plus de 80 %. Les résultats chez les patientes ont été superposables. La congélation autorise un taux de survie folliculaire satisfaisant. La restitution par greffe du tissu ovarien congelé et réchauffé a permis de restaurer des cycles menstruels et surtout d'obtenir des grossesses et des naissances. Ces grossesses ont été obtenues soit spontanément soit après fécondation in vitro. La restauration de la fertilité a autorisé un formidable espoir pour les patientes devant affronter à la fois la maladie et la stérilité définitive. Elle a aussi permis de très fortes avancées en biologie et médecine de la reproduction.

* Médecine de la Reproduction, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Femme Mère Enfants, Lyon-Bron. INSERM unité 846, Cellules Souches et cerveau, Lyon-Bron.

Tirés à part : Professeur Bruno SALLE, Médecine de la Reproduction, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Femme Mère Enfants, 59 boulevard Pinel — 69500 Bron.

Article reçu le 24 mai 2013, accepté le 27 mai 2013

SUMMARY

In recent decades, reproductive surgery and medicine have entered a new era of prevention. Oocyte freezing is at the heart of this new era, along with the preservation of female fertility. Several options are being evaluated, and time will tell which one will prove most suitable for routine use. Currently, only the freezing and transplantation of ovarian tissue seems to have entered clinical practice. Animal studies demonstrated its effectiveness, with pregnancies and births in several species. These studies showed that both slow and rapid freezing (vitrification) allows the survival of more than 80 % of primordial follicles after thawing. Similar results have since been obtained in humans. Freezing allows satisfactory follicular survival. Reimplantation of frozen ovarian tissue has helped to restore menstrual cycling and, more importantly, to obtain pregnancies and births, either spontaneously or by IVF. This restoration of fertility offers great hope for female patients having to confront not only their disease but also the prospect of permanent infertility. Related research has led to major advances in biology and reproductive medicine.

INTRODUCTION

L'idée de la transplantation ovarienne est ancienne et a débuté au début du xx^e siècle. Les objectifs étaient de maintenir une fonction endocrine et non pas de restaurer la fertilité à cette époque. Théobald [1] et son équipe ont été le premier à réaliser une auto transplantation ovarienne hétérotopique au niveau de l'avant-bras. Cette transplantation ovarienne a fonctionné de nombreuses années. Il s'agissait bien évidemment de tissus non congelés.

La préservation de la fertilité est un souci constant pour les équipes médicales prenant en charge les pathologies cancéreuses et pour les équipes spécialisées en procréation médicalement assistée. Les procédures sont anciennes et bien connues chez l'homme. Elles sont encore balbutiantes chez la femme et loin d'être codifiées. Les données expérimentales sont bien sûr animales avec de nombreuses publications sur le sujet mais aussi humaines, bien que nous ayons l'impression d'être rentrés dans une sorte de routine, les conduites à tenir et les procédures cryobiologiques et chirurgicales sont loin d'être standardisées.

COMMENT PRÉSERVER L'INFERTILITÉ AVANT TRAITEMENT STÉRILISANT ?

Les options sont nombreuses : la congélation embryonnaire, ovocytaire, ovarienne, maturation *in vitro*, mise au repos de la fonction ovarienne [2]. La plupart de ses options sont encore purement hypothétiques. Certaines sont irréalisables en pratique, d'autres inutiles.

La congélation embryonnaire s'adresse au couple. Elle permet de congeler un certain nombre d'embryons transférables une fois la patiente guérie. Elle souffre de

différents inconvénients. La réalisation d'une stimulation de l'ovulation nécessite entre 4 et 6 semaines de traitement. L'état général et la nécessité de débiter une chimiothérapie urgente n'autorisent pas toujours ce délai nécessaire. Le nombre d'embryons congelables et transférables n'est jamais très élevé. Le taux de grossesse par transfert plafonne entre 20 et 30 %, 30 % au mieux [3].

La congélation ovocytaire peut être envisagée pour une femme seule et pubère. Une fois réchauffés, les ovocytes peuvent être fécondés et les embryons transférés. L'inconvénient des délais et de nombres est identique à ceux évoqués pour la congélation embryonnaire. Même en utilisant des procédures de congélation rapide, nommées vitrification, pour obtenir une grossesse, il faut recueillir et vitrifier entre 8 et 10 ovocytes, alors que le nombre moyen obtenu par ponction folliculaire excède rarement 10 à 15 [3]. Les espoirs mis dans la congélation ovocytaire nous semblent exagérés. Que ce soit pour ces deux premières procédures, il est admis et prouvé que les réponses à la stimulation folliculaire en cas de pathologie maligne sont de qualité significativement diminuée. Ce phénomène était bien connu chez l'homme où la qualité des prélèvements spermatiques en cas de pathologie cancéreuse est diminuée et ce avant tout traitement.

La maturation *in vitro* est une procédure parfois proposée dans le cadre du syndrome des ovaires micro-poly-kystiques. Il consiste à recueillir des vésicules germinatives et à les faire maturer *in vitro* jusqu'au stade d'ovocytes mûrs, au stade de métaphase II [4]. Ces ovocytes sont ensuite vitrifiés. Ce concept est un concept intéressant dans des indications comme les leucémies ou cancer du sein. Les premières en raison du risque de réintroduction de cellules malignes, le second en raison du risque d'hormono-dépendance. Cependant la technique est une procédure difficile et aléatoire et le nombre d'ovocytes vitrifiables oscille entre 1 et 14 en fonction des données de la littérature [5].

La mise au repos ovarienne est une procédure envisagée afin de protéger le capital de follicules primordiaux au cours des traitements antiméiotiques ou au cours de radiothérapies pelviennes. L'objectif est de protéger les cellules en division de l'action de ces derniers. Cependant, un certain nombre d'antiméiotiques ont eu une action toxique directe sur le follicule primordial. La radiothérapie a le même effet. La majorité des études ont évalué l'effet protecteur des analogues du GnRH. Les résultats sont controversés et les fonctions ovariennes n'ont pas été évaluées sur le long terme. Les auteurs estiment que les patientes ayant un cycle menstruel ont été protégées. Ils ont rarement réalisé des bilans de réserve ovarienne avant et après traitements.

Toutes ces procédures ayant beaucoup de failles, la congélation de tissus ovariens s'est révélée la procédure la plus simple à mettre en place.

La congélation de tissu ovarien permet de stocker un grand nombre de follicules prévus et primordiaux. Elle nécessite une coelioscopie au cours de laquelle est réalisée le plus souvent une ovariectomie. L'ovaire est ensuite préparé. Seul le cortex est découpé en minces lamelles de faible épaisseur et de surface variable et ces

lamelles de cortex sont ensuite stockées dans la zone liquide. Cette coelioscopie peut être réalisée en urgence généralement avant toute chimiothérapie. Le devenir du tissu ovarien est lui problématique [6].

Le tissu ovarien peut être réintroduit par greffe hétérotopique, dans un site autre que la cavité pelvienne, sous le revêtement cutané dans un muscle ou autre. La greffe peut être réalisée de façon orthotopique en restituant le tissu ovarien après réchauffement dans la cavité pelvienne permettant éventuellement une grossesse spontanée. La procédure chirurgicale est plus longue et plus difficile que la greffe hétérotopique [7].

La greffe xéno greffe consiste à placer le tissu ovarien dans un sujet autre comme les souris SCID ou Nude [8]. Elle est simple à réaliser et permet de réaliser une fécondation *in vitro* après stimulation par gonadotrophines. Les risques sanitaires et les réserves éthiques ont rendu la xéno greffe, même si elle est intellectuellement séduisante, inenvisageable actuellement.

Données expérimentales animales

L'essor de la congélation ovarienne débute indubitablement après la publication de Gosden et son équipe en 1994 [9]. Ils ont été les premiers à rapporter une gestation et une naissance après congélation/décongélation et greffe orthotopique chez la brebis. Il en a suivi de nombreuses publications. La plupart des travaux ont été réalisés chez la brebis dont l'ovaire présente de grandes similitudes avec l'ovaire humain. La taille de l'animal est compatible avec une recherche chez les grands mammifères [10].

Des naissances et des gestations ont été rapportées ensuite par de nombreuses équipes. Les études cryobiologiques ont confirmé un taux de survie à la séquence congélation/décongélation d'environ 85 % en protocole lent. Les techniques de greffe par apposition sont à l'origine d'une perte folliculaire en raison d'une ischémie post-greffe, en raison du temps nécessaire de la mise en place de la néovascularisation. Cette perte folliculaire explique la courte durée de vie des greffons. Le taux de survie après greffe varie selon les études entre 5 % et 28 % [11].

Les études animales ont confirmé que la congélation de fragments tissulaires ovariens est possible. La greffe par apposition est une technique chirurgicale simple, la reprise fonctionnelle nécessite un délai de 4 mois. Les résultats de la greffe hétérotopique ont été décevants. Des ovocytes ont été recueillis et fécondés. Des blastocystes ont été obtenus. Ces derniers n'ont pas été transférés. Les causes vraisemblables de ces résultats mitigés sont multiples. La température locale inadéquate, pression locale excessive, vascularisation pauvre dans les hypothèses émises.

Les expérimentations humaines

Dès les premiers résultats encourageants les protocoles de congélation et de greffe orthotopique chez l'animal, des programmes de préservation de l'infertilité se sont développés dans toutes les équipes de médecine et chirurgie de la reproduction.

Les indications sont majeures et représentées par les hémopathies, les lymphomes, les sarcomes, puis cancers du sein des femmes jeunes ont pris une place de plus en plus importante. Enfin un certain nombre de pathologies non malignes ont trouvé leur place dans les indications (lupus nécessitant un traitement antimitotique au long cours par exemple) [12].

La première greffe a été réalisée en 2000 par le Professeur Oktay [7]. L'indication était une récurrence de kyste séreux de l'ovaire. Quatre fragments de tissu ovarien sont greffés par coelioscopie au niveau du ligament large. 15 semaines après la greffe une stimulation de l'ovulation est réalisée. Malgré l'apparition d'un corps jaune et d'une augmentation de la concentration de stéroïdes, aucune grossesse n'a été obtenue.

Après plusieurs publications sans suite, la première naissance a été rapportée par l'équipe du Professeur Donnez en 2004 [13]. L'observation est une observation classique d'une femme devant être traitée par chimiothérapie et radiothérapie sus médiastinale dans le cadre d'une maladie de Hodgkin stade 4, après rémission complète en 2001. La greffe s'est faite en deux temps. Cinq mois après la greffe les cycles étaient anovulatoires. Une deuxième greffe a été réalisée devant l'arrêt de la fonction des premiers greffons. Il s'agissait d'une greffe orthotopique et une naissance a été obtenue après une grossesse spontanée [14].

Le tableau 1 résume les observations de naissances publiées l'année dernière. 18 enfants sont nés officiellement. Officieusement, 24 à 28 dans le monde. La simple lecture de ce tableau mais aussi des articles confirme le caractère expérimental des prises en charge. Les âges de prise en charge pour la congélation peuvent monter jusqu'à 37ans, âge ou les chances de grossesses en PMA chutent, et ou la réserve ovarienne peut être largement entamée. Les prélèvements ont été réalisés avant ou après chimiothérapie [15]. Les grossesses ont été obtenues soient naturellement, soit pas stimulation simple ou encore par fécondation *in vitro*. La liste détaillée des publications montre que la reprise en 4 mois de la fonction ovarienne correspond au taux nécessaire à un cycle de folliculogénèse [16]. Les techniques de congélation sont

TABLEAU 1. — Résumé des naissances publiées dans le monde d'après Grynberg

Worldwide frozen ovarian cortical tissue transplantations live births.						
Case no.	Diagnosis	Age at cryopreservation (y)	Chemotherapy before cryopreservation	Conception	Babies	Authors
1	Hodgkin's lymphoma	25	No	Natural	1	Donnez et al.
2	Neurotumor	19	No	Natural	1	Donnez et al.
3	Non-Hodgkin's lymphoma	28	Yes	IVF-ET	1	Meirow et al.
4	Hodgkin's lymphoma	24	Yes	Natural	2	Demeestere et al.
5	Ewing sarcoma	27	No	IVF-ET and natural	2	Andersen et al.
6	Hodgkin's lymphoma	25	Yes	IVF-ET	1	Andersen et al.
7	Premature ovarian failure	25	No	Natural	1	Silber et al.
8	Hodgkin's lymphoma	20	No	Natural	2	Silber et al.
9	Polyangiitis	27	Yes	IVF-ET	1	Piver et al.
10	Breast cancer	36	No	IVF-ET	2	Pellicer et al.
11	Sickle cells	27	No	Natural	1	Piver et al.
12	Thalassemia	19	No	IVF-ET	2	Revel et al.
13	Hodgkin's lymphoma	27	Yes	Ovulation induction	1	Dittrich et al.

Note: Total, 13 patients and 18 babies.
Grynberg. Ovarian and follicle transplantation. Fertil Steril 2012.

homogènes, les techniques de chirurgie non réalisée en un temps opératoire d'autres en deux temps [17]. La greffe ovarienne a été réalisée soit sur l'ovaire restant soit sur le péritoine pelvien [18]. Les techniques chirurgicales ont été réalisées soit par suture soit par emmaillotement du tissu ovarien. Le nombre de greffes réalisées dans le monde est inconnu. Les équipes ne publient pas leurs échecs et aucune base de données internationales n'a été créée [19].

L'exemple de Lyon est tout à fait typique. Nous avons débuté la première greffe de tissu ovarien en 2002 avec une technique chirurgicale en deux temps. Depuis 2002 nous avons réalisé 7 greffes en tout, dont 5 très récemment et dont les résultats sont en attente. Dans tous les cas nous avons obtenu la reprise des cycles. Nous avons réalisé des fécondations *in vitro*. Les trois premières patientes ont eu un recueil d'un ovocyte mature à chaque fois mais sans division cellulaire et donc sans transfert embryonnaire. La dernière fécondation *in vitro* réalisée cette année a permis un transfert embryonnaire mais pas de grossesse. Nous rapportons en 2014 une première grossesse chez une femme traitée il y a douze ans pour une leucémie aigüe. Le tissu ovarien a été conservé douze ans. Une grossesse spontanée est survenue deux ans après la restauration du tissu ovarien.

CONCLUSION

La préservation de l'infertilité féminine est encore un protocole expérimental et aléatoire. L'avenir ce sera peut-être à la maturation *in vitro* qui permettra de se dédouaner de la chirurgie mais à notre sens l'avenir sera sûrement à la prise en charge du cancer par des thérapies non gonadotoxiques comme il a été récemment publié dans le cadre de leucémie. Alors l'avenir ne sera peut-être plus à la congélation et la greffe ovarienne

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MULLER G., VON THEOBALD P., LEVY G., ROFFE J.L., LE PORRIER M. — First heterotopic ovarian autotransplantation in the female. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)*, 1988, 17(1), 97-102.
- [2] LORNAGE J., SALLE B. — Ovarian and oocyte cryopreservation. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 2007, 19(4), 390-4.
- [3] CHUNG K., DONNEZ J., GINSBURG E., MEIROW D. — Emergency IVF versus ovarian tissue cryopreservation: decision making in fertility preservation for female cancer patients. *Fertil. Steril.*, 2013, 99(6), 1534-42.
- [4] GRYNBERG M., EL HACHEM H., DE BANTEL A., BENARD J., LE PARCO S., FANCHIN R. — In vitro maturation of oocytes: uncommon indications. *Fertil. Steril.*, 2013, 99(5), 1182-8.

- [5] GRYNBERG M., POULAIN M., SEBAG-PEYRELEVADE S., LE PARCO S., FANCHIN R., FRYDMAN N. — Ovarian tissue and follicle transplantation as an option for fertility preservation. *Fertil. Steril.*, 2012, 97(6), 1260-8.
- [6] VON WOLFF M., DONNEZ J., HOVATTA O., KEROS V., MALTARIS T., MONTAG 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*, 2009, 45(9), 1547-53.
- [7] OKTAY K., BUYUK E., VEECK L., ZANINOVIC N., XU K., TAKEUCHI T., *et al.* — Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, 2004, 363(9412), 837-40.
- [8] GOSDEN R.G., BAIRD D.T., WADE J.C., WEBB R. — Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Hum. Reprod.*, 1994, 9(4), 597-603.
- [9] DATH C., VAN EYCK A.S., DOLMANS M.M., ROMEU L., DELLE VIGNE L., DONNEZ J., *et al.* — Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. *Hum. Reprod.*, 2010, 25(7), 1734-4.
- [10] SALLE B., DEMIRCI B., FRANCK M., RUDIGOZ R.C., GUERIN J.F., LORNAGE J. — Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil. Steril.*, 2002, 77(2), 403-8.
- [11] MASSARDIER J., COURBIERE B., LORNAGE J., MAZOYER C., POIREL M.T., MARTINOT S., *et al.* — Technical aspects of laparoscopic ovarian autograft in ewes after cryopreservation by slow-cooling protocol. *Reprod. Domest. Anim.*, 2010, 45(1), 8-12.
- [12] BORDES A., LORNAGE J., DEMIRCI B., FRANCK M., COURBIERE B., GUÉRIN J.F., *et al.* — Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. *Hum. Reprod.*, 2005, 20(10), 2745-2748.
- [13] DONNEZ J., SQUIFFLET J., JADOU L., DEMYILLE D., CHERON A.C., *et al.* — Pregnancy and live birth after autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue in a patient with metastatic disease undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Fertil. Steril.*, 2011, 95(5), 1787.e1-4.
- [14] DONNEZ J., DOLMANS M.M., DEMYILLE D., JADOU L., PIRARD C., SQUIFFLET J., *et al.* — Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, 2004, 364(9443), 1405-10.
- [15] ANDERSEN C.Y., ROSENDAHL M., BYSKOV A.G., LOFT A., OTTOSEN C., DUEHOLM M., *et al.* — Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum. Reprod.*, 2008, 23(10), 2266-72.
- [16] MEIROW D., LEVRON J., EL-DAR-GEVA T., HARDAN I., FRIDMAN E., ZALEL Y., *et al.* — Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 353(3), 318-21.
- [17] ROUX C., AMIOT C., AGNANI G., AUBARD Y., ROHRLICH P.S., PIVER P. — Live birth after ovarian tissue autograft in a patient with sickle cell disease treated by allogeneic bone marrow transplantation. *Fertil. Steril.*, 2010, 93(7), 2413.e15-9.
- [18] DONNEZ J., DOLMANS M.M., PELLICER A., DIAZ-GARCIA C., SANCHEZ SERRANO M., SCHMIDT K.T., *et al.* — Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil. Steril.*, 2013, 99(6), 1503-13.
- [19] SILBER S.J. — Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. *Mol. Hum. Reprod.*, 2012, 18(2), 59-67.

