

Autogreffe de tissu ovarien cryoconservé : bilan et perspectives d'utilisations

V. NETO, P. GUÉRIN, P. SALVETTI, A.C.LEFRANC, S. BUFF, T. JOLY

Unité Cryobio ENV Lyon/ISARA Lyon, Université de Lyon,
Ecole Nationale Vétérinaire, 69280 Marcy l'Etoile, France.. cryobio@vet-lyon.fr

Résumé: La congélation du tissu ovarien permet de conserver simultanément les milliers de follicules immatures de la réserve ovarienne. Les follicules ainsi congelés nécessitent la mise au point d'une technique permettant la reprise de la folliculogénèse et l'obtention de follicules matures fécondables. Cette étude avait pour objectif de mettre au point une technique d'autogreffe orthotopique permettant la reprise de la croissance folliculaire après congélation lente du tissu ovarien et de valider le protocole de congélation. Huit lapines ont été ovariectomisées, 16 ont reçu une greffe bilatérale de tissu frais et 16 ont reçu une greffe unilatérale de tissu congelé, puis toutes les femelles ont été inséminées durant 10 cycles. Aucune gestation n'a été obtenue dans le groupe ovariectomisé, 15 et 9 lapereaux sont nés respectivement après greffe de tissu ovarien frais et congelé/décongelé.

Abstract: Cryopreserved ovarian tissue autograft : assessment and further perspectives. Ovarian tissue freezing allows preserving simultaneously thousands of immature follicles of the ovarian stock. This follicles need to define a technique to restore folliculogenesis and to obtain mature follicles. The objective of this study was to define a technique of orthotopic autograft allowing the restoration of the follicular growth after slow freezing of the ovarian tissue, and to validate the freezing protocol. Eight doe rabbits were ovariectomized, 16 received a fresh ovarian tissue bilateral graft and 16 received a frozen ovarian tissue unilateral graft. Inseminations were performed during the next 10 successive cycles. No pregnancy was obtained in ovariectomized group, 15 and 9 pups were born after fresh and frozen/thawed ovarian tissue graft respectively.

Introduction

La congélation du cortex ovarien est une technique novatrice qui a été développée chez la femme dans l'objectif de conserver le potentiel reproducteur des jeunes patientes devant subir un traitement potentiellement stérilisant. Le principe consiste à isoler la zone périphérique de l'ovaire, le cortex ovarien, contenant la réserve folliculaire, puis à l'incuber dans la solution cryoprotectrice avant de la congeler selon un protocole adapté aux différents types cellulaires du tissu ovarien. Le protocole de congélation doit ainsi permettre la conservation des ovocytes, mais aussi celle des cellules folliculaires et des cellules du stroma. Cependant, seuls les follicules primordiaux à primaires peuvent être préservés en raison de leur taille et de leur stade métabolique mieux adaptés aux contraintes des basses températures. Après décongélation et retrait des cryoprotecteurs, les follicules ainsi conservés doivent reprendre leur croissance pour atteindre le stade fécondable. La reprise de cette croissance folliculaire peut être obtenue après greffe (autogreffe, allogreffe ou xélogreffe) ou culture *in vitro* (Aubard, *et al*, 2002). Des naissances ont ainsi été obtenues après autogreffe orthotopique (greffe sur le site d'origine de l'organe) de cortex ovarien cryoconservé chez la brebis (Gosden, *et al*, 1994 ; Salle, *et al*, 2002), la lapine (Almodin, *et al*, 2004) et récemment chez la femme (Donnez, *et al*, 2004 ; Meirow, *et al*, 2005)

Chez le lapin, la congélation de tissu ovarien pourrait constituer une nouvelle technique de conservation des ressources génétiques par la voie femelle, mais aussi représenter une technique de

conservation d'urgence en cas d'épizootie par exemple. Ainsi, cet outil serait complémentaire aux techniques de congélation de semence et d'embryons déjà utilisées pour sauvegarder le patrimoine génétique animal dans la cryobanque nationale (Joly, *et al*, 2003). Cependant chez cette espèce, la technique de greffe orthotopique par apposition doit être définie.

Bien que les protocoles de congélation soient évalués en premier lieu par des tests *in vitro*, il est indispensable de les valider par l'obtention de naissances issues des follicules contenus dans le tissu ovarien congelé.

L'objectif de ce travail était (1) de valider la technique de greffe orthotopique et d'évaluer la capacité des follicules à survivre à l'ischémie précédant la revascularisation, mais aussi (2) d'évaluer la capacité de reprise de la folliculogénèse après congélation lente du tissu ovarien et valider ainsi le protocole de congélation.

1. Matériel et Méthodes

1.1. Origine des animaux

Quarante lapines de souche Hycole GPD âgées de 10 à 23 semaines ont été divisées en 3 groupes :

- un groupe témoin ovariectomisé (n=8) selon la technique d'ablation des ovaires pratiquée dans le cas des greffes,
- un groupe greffé (autogreffe orthotopique bilatérale) avec du tissu ovarien non congelé (n=16),
- un groupe greffé (autogreffe orthotopique unilatérale) avec du tissu ovarien congelé/décongelé (n=16). L'ovaire controlatéral a été retiré.

1.2. Congélation du tissu ovarien

Le prélèvement et la greffe ont été réalisés par laparotomie médio-ventrale. Après ablation, les ovaires ont été placés dans du TCM 199 (Sigma, USA) à température ambiante et disséqués délicatement jusqu'à obtenir un cortex ovarien de 1mm d'épaisseur. Pour chaque ovaire, deux fragments de cortex ont été obtenus : l'un est destiné à être greffé (avec ou sans congélation), tandis que le second est fixé dans du paraformaldéhyde 4% pour l'analyse histologique. Il servira de témoin avant greffe ou après congélation. Dans le cas des greffes de tissu ovarien congelé, l'ovaire controlatéral retiré servira de témoin non congelé.

Après isolement, les cortex ont été équilibrés dans trois bains de concentration croissante en cryoprotecteur (0,5 ; 1 & 1,5M 1,2-propanediol -PROH-) de 5 min chacun à température ambiante. La solution de congélation était composée de TCM 199 supplémenté par 10% SVF, 1,5M PROH et 0,2M tréhalose. La congélation des cortex ovariens a été réalisée en paillette CBS (IMV, France) 1ml à l'aide d'un congélateur programmable (Freeze Control CL 8800, Cryologic, Australie). Les cortex ovariens ont été refroidis de 21°C à -7°C à 2°C/min. Après 2 min à -7°C, l'induction de la cristallisation a été réalisée manuellement. Les paillettes ont été maintenues à cette température pendant 5 min. Puis les fragments ovariens ont été congelés à 0,3°C/min jusqu'à -35°C, et rapidement refroidis jusqu'à -140°C (4°C/min en moyenne ; cinétique non contrôlée par le congélateur) avant immersion dans l'azote liquide.

Le tissu ovarien a été décongelé à 37°C et les cryoprotecteurs retirés dans trois bains successifs de concentration décroissante en PROH (1, 0,5 & 0M PROH), en présence de tréhalose. Il a été finalement immergé dans une solution de TCM199 supplémentée par 10% de SVF (Neto, *et al*, 2007).

1.3. Evaluation morphologique

Les fragments ovariens avant et/ou après congélation/décongélation ont été fixés dans du paraformaldéhyde et traités pour l'analyse histologique (coupes semi-sériées de 4µm tous les 10µm ; coloration à l'hématoxyline-éosine). Pour chaque fragment, 100 follicules (primordiaux à primaires) ont été observés et classés en 4 catégories selon la description détaillée par Neto *et al* (2007) :

- follicules sans défaut de morphologie;
- follicules avec défaut cytoplasmique;
- follicules avec défaut nucléaire;
- follicules dégénérés. Seuls les follicules dont le noyau était visible ont été dénombrés.

1.4. Autogreffe orthotopique

Le protocole de greffe a été approuvé par le Comité d'éthique de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. Les chirurgies ont été réalisées sous anesthésie gazeuse. Une antibioprévention (enrofloxacin 10 mg/kg, Baytril®, Bayer, Allemagne) et une prise en charge de la douleur (méloxicam 0,2 mg/kg, Métacam®, Boehringer Ingelheim, Belgique) ont été réalisées.

Pour le groupe ayant reçu une greffe de tissu ovarien frais, des greffes ipsilatérales ont été réalisées immédiatement après l'ablation de l'ovaire et l'isolement du cortex ovarien. Pour le groupe ayant reçu une greffe de tissu ovarien congelé/décongelé, des greffes controlatérales ont été réalisées 24h après l'ablation de l'ovaire et la congélation du tissu ovarien. Le retrait extemporané de l'ovaire controlatéral a permis de disposer d'un site de greffe frais pour transplanter le tissu ovarien congelé/décongelé.

La greffe a été réalisée par apposition du tissu ovarien sur le pédicule vasculaire conservé lors de l'exérèse de l'ovaire. Quatre à 6 points de suture ont été réalisés (fil non résorbable Prolène® 7.0, Ethicon®) pour assurer le maintien du greffon et l'hémostase. L'intégrité de l'ovaire retiré a été vérifiée sous loupe binoculaire.

Six semaines après la greffe, les lapines ont été inséminées toutes les 3 semaines (sauf en cas de gestation) avec un mélange de semence de plusieurs mâles dont la fertilité avait été contrôlée. Le diagnostic de gestation a été réalisé par palpation 12 à 14 jours après l'insémination. Les inséminations ont été poursuivies pendant 10 cycles successifs.

Neuf mois après la greffe, les lapines ont été euthanasiées. Les greffons ont été observés pour recenser les structures folliculaires matures. Les adhérences péri-ovariennes ont été observées tandis que la perméabilité de l'oviducte a été vérifiée.

1.4 Analyse statistique

Les proportions de follicules de chaque type de défaut ont été comparées par une analyse de variance à un facteur contrôlé (facteur congélation) (ANOVA, StatView SAS Institute Inc). Les différences ont été considérées comme significative si $p < 0,05$.

2. Résultats :

2.1. Congélation du tissu ovarien

Avant congélation le tissu ovarien présentait $82,6 \pm 2,8$ % de follicules sans défaut (tableau 1). Après congélation/décongélation, cette proportion était significativement réduite à $65,8 \pm 4,8$ % ($p = 0,0025$). Parallèlement, le pourcentage de follicules dégénérés a augmenté au cours de la congélation ($8,7$ vs $20,6$ %, $p = 0,005$) alors que la fréquence des défauts de cytoplasme et de noyau a peu varié.

Tableau 1 : Proportion de follicules de chaque catégorie morphologique avant et après congélation

Morphologie folliculaire	Avant congélation	Après congélation	<i>p</i>
Sans défaut	82,6±2,8 %	65,8±4,8 %*	<i>p</i> = 0,0025
Défaut du cytoplasme	6,7±1,3%	10,9±2,7%	<i>p</i> = 0,13
Défaut du noyau	1,9±0,7%	2,6±0,5%	<i>p</i> = 0,40
Dégénéré	8,7±1,9%	20,6±3,9%*	<i>p</i> = 0,005

*différence significative après congélation

2.2. Greffe de tissu ovarien

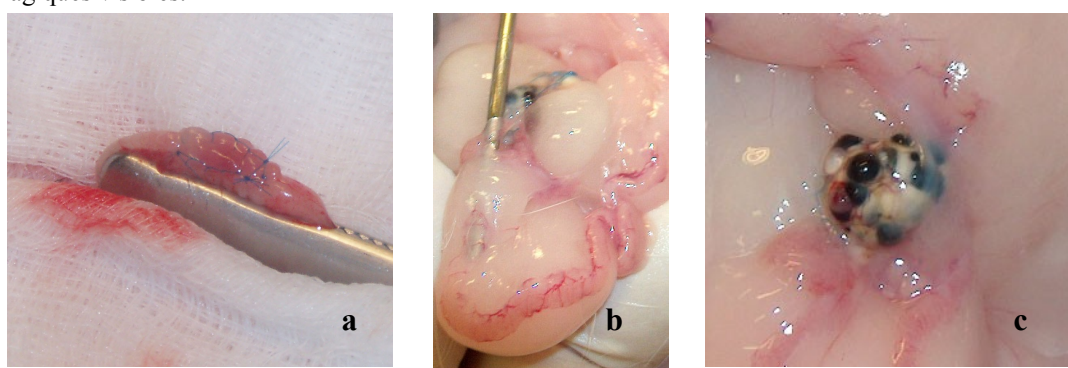
Aucune lapine du groupe témoin ovariectomisé n'a mené de gestation. Après greffe bilatérale de tissu ovarien frais, 6 femelles sur 16 ont été gestantes : 2 ont été gestantes 4 fois, 1 a été gestante deux fois, soit au total à 13 gestations menées à terme. Quinze lapereaux dont 9 vivants sont nés. Deux femelles sont mortes avant autopsie. Des structures folliculaires et notamment des follicules hémorragiques ont été observés sur au moins un des deux greffons de 8 femelles. L'oviducte est apparu perméable sur le site d'au moins un des deux greffons chez 13 femelles, tandis que d'importantes adhérences graisseuses péri-ovariennes ont été observées chez 14 femelles (figure 1).

Après greffe unilatérale de tissu ovarien

congelé/décongelé, 3 femelles sur 16 ont été gestantes. Une femelle a mené 3 gestations, une autre 2 gestations et la troisième lapine a mené une gestation. Au total, 6 gestations ont été menées à terme et 9 lapereaux sont nés dont 4 vivants. Cinq femelles sont mortes au cours du protocole et n'ont pu être autopsiées. Des follicules hémorragiques ont été observés 9 mois après la greffe chez 7 femelles. L'oviducte était perméable chez 6 femelles, tandis que des adhérences péri-ovariennes ont été recensées chez 10 lapines (figure 1).

Parmi les gestations menées à terme, la taille de portée était fortement réduite (1 à 2 lapereaux par portée). En cas de naissance unique, une durée de mise bas anormalement longue, une augmentation du poids de naissance, ainsi qu'un fort taux de mortalité ont été observés. L'influence de l'âge des lapines n'a pu être mis en évidence.

Figure 1 : a/ cortex ovarien greffé, b/ oviducte perméable, c/ greffon ovarien 9 mois après la greffe. Follicules hémorragiques visibles.



3. Discussion

Les résultats de cette étude suggèrent que la congélation du tissu ovarien de lapine est une technique prometteuse. Bien que la proportion de follicules normaux soit réduite après congélation, le pourcentage obtenu semble suffisant pour permettre la conservation du potentiel reproducteur des lapines.

Le protocole de congélation basé sur une solution cryoprotectrice composée de PROH et de tréhalose semble adapté aux caractéristiques du tissu ovarien de l'espèce étudiée. Chez d'autres espèces, et notamment la souris (Candy, *et al*, 1997), la brebis (Santos, *et al*, 2006) et la chèvre (Rodrigues, *et al*, 2004), le DMSO semble mieux conserver les structures folliculaire lors de la congélation en comparaison avec le PROH. Par contre, chez la femme (Hovatta, *et al*, 1996) ou la vache (Lucci, *et*

al, 2004), un effet similaire des deux cryoprotecteurs cités a été rapporté. L'utilisation du tréhalose comme cryoprotecteur non pénétrant a principalement été rapporté pour la congélation d'embryons. Cependant, les propriétés de ce di-olose semblent s'appliquer lors de la congélation du tissu ovarien. Ainsi, en augmentant l'osmolarité du milieu de rinçage après décongélation, il prévient le gonflement cellulaire dû à l'influx rapide d'eau dans la cellule lors du retrait du cryoprotecteur pénétrant. Il possède également la propriété de stabiliser les membranes cellulaires (Crowe, *et al*, 1984). Associé au PROH, il semble permettre une meilleure conservation du tissu ovarien de lapine par rapport au saccharose, plus communément utilisé (Neto, *et al*, 2007).

L'autogreffe orthotopique du tissu ovarien frais ou cryoconservé a permis des naissances. La technique

de greffe orthotopique par apposition du cortex ovarien sur le pédicule vasculaire, mise au point chez la brebis (Salle, *et al*, 2002), semble donc pouvoir être utilisée chez la lapine. Cependant, le faible nombre de naissances semble être le signe d'une perte folliculaire importante, probablement due à la durée de l'ischémie précédant la revascularisation du tissu. Le développement d'importantes adhérences péri-ovariennes, principalement de nature graisseuse, pourrait également être à l'origine de défaut d'ovulation ou de défauts de descente oviductaire, même si l'intégrité de l'oviducte semble être bien préservée. Ces adhérences graisseuses paraissent particulièrement développées chez l'espèce étudiée et ont également été observées par d'autres auteurs (Daniel, *et al*, 1983 ; Petroianu, *et al*, 2002).

Bien que le nombre de lapereaux issus de tissu congelé apparaisse inférieur à celui des lapereaux issus de tissu frais, les résultats sont proches. En effet, le nombre de naissances est à relativiser dans la mesure où les greffes de tissu frais étaient bilatérales, contrairement à celles réalisées avec du tissu congelé. Une forte proportion de greffons présentait des structures folliculaires 9 mois après la greffe, signe d'une reprise de la croissance folliculaire même après congélation.

La forte réduction de la taille de portée peut refléter une anomalie d'ovulation, une diminution du nombre d'ovulations, une anomalie des ovocytes ou un défaut de descente oviductaire du fait d'un défaut de recouvrement du greffon par le pavillon. Cependant, le fort taux de mortalité s'explique probablement par les complications dystociques induites par l'incidence accrue des gestations monofœtales.

Conclusion

Des lapereaux sont ainsi nés de tissu ovarien frais et congelé, après autogreffe orthotopique. Ces naissances confirment la faisabilité de la technique de greffe chez cette espèce et l'efficacité du protocole de congélation utilisant une solution cryoprotectrice composée de PROH et de tréhalose. Cependant, pour que cette technique puisse être utilisée pour conserver les ressources génétiques animales, il sera nécessaire de confirmer ces résultats après allogreffe.

Remerciements :

Nous tenons à remercier la région Rhône-Alpes pour son soutien financier et la société Hycol® pour son aide technique.

Références

ALMODIN C.G., MINGUETTI-CAMARA V.C., MEISTER H., FERREIRA J.O., FRANCO R.L., CAVALCANTE A.A., RADAELLI M.R., BAHLS A.S., MORON A.F., MURTA C.G., 2004. Recovery of fertility after grafting

of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy. *Hum. Reprod.*, 19,1287-1293.

AUBARD Y., POIROT C., PIVER P., 2002. Cryopreservation of ovarian tissue. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 30, 358-366.

CANDY C.J., WOOD M.J., WHITTINGHAM D.G., 1997. Effect of cryopreservation on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J. Reprod. Fertil.*, 110, 11-19.

CROWE L.M., MORADIAN R., CROWE J.H., JACKSON S.A., WOMERSLEY C., 1984. Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochim. Biophys. Acta.*, 769, 141-150.

DANIEL J.C., JOHN M.F., RICHARDSON P., 1983. Return to partial function of rabbit ovaries after cryopreservation in liquid nitrogen. *Theriogenology*, 19, 405-412.

DONNEZ J., DOLMANS M.M., DEMYLLE D., JADOU L., PIRARD C., SQUIFFLET J., MARTINEZ MADRID B., VAN LANGENDONCKT A., 2004. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, 364, 1405-1410.

GOSDEN R.G., BAIRD D.T., WADE J.C., WEBB R., 1994. restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degree C. *Hum. Reprod.*, 9, 597-603.

HOVATTA O., SILYE R., KRAUSZ T., ABIR R., MARGARA R., TREW G.; LASS A., WINSTON R.M., 1996. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulfoxide and propandiol-sucrose as cryoprotectants. *Hum. Reprod.*, 11, 1268-1272.

JOLY T., BOLET G., THEAU-CLEMENT M., FALIERES J., DE ROCHAMBEAU H., RENARD J.P., 2003. La cryobanque Nationale : une mise en œuvre adaptée pour l'espèce lapin. *10^{èmes} Journ. Rech. Cunicole Fr.*, Paris, 19-20/11/2003. ITAVI Ed., Paris.

LUCCI C.M., KACINSKIS M.A., LOPES L.H., RUMPF R., BAO S.N., 2004. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology*, 61, 1101-1114.

MEIROW D., LEVRON J., EL-DAR-GEVA T., HARDAN I., FRIDMAN E., ZALEL Y., SCHIFF E., DOR J., 2005. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N. Engl. J. Med.*, 353, 318-321.

NETO V., BUFF S., LORNAGE J., BOTTOLIER B., GUERIN P., JOLY T., 2007. Effect of different freezing parameters on the morphology and viability of preantral follicles after cryopreservation of doe rabbit ovarian tissue. *Fertil. Steril.*, sous presse.

PETROIANU A., DE SOUZA VASCONCELLOS L., ALBERTI L.R., FONSECA DE CASTRO L.P., BARBOSA LEITE J.M., 2002. Natural pregnancy in rabbits that underwent oophorectomy and orthotopic allogeneic or autologous ovarian transplantation. *Fertil. Steril.*, 77, 1298-1299.

RODRIGUES A.P.R., AMORIM C.A., COSTA S.H.F., MATOS M.H.T., SANTOS R.R., LUCCI C.M., BAO S.N., OHASHI O.M., FIGUEIREDO J.R., 2004. cryopreservation of caprine ovarian tissue using DMSO and propandiol. *Anim. Reprod. Sci.*, 84, 211-227.

SALLE B., DEMIRCI B., FRANCK M., RUDIGOZ R.C., GUERIN J.F., LORNAGE J., 2002. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil. Steril.*, 77, 403-408.

SANTOS R.R., RODRIGUES A.P.R., COSTA S.H.F., SILVA J.R.V., MATOS M.H.T., LUCCI C.M., BAO S.N., VAN DEN HURK R., FIGUEIREDO J.R., 2006. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, 91, 249-263.