

# Préservation de la fertilité chez les patientes cancéreuses : création d'un ovaire artificiel. Allogreffe de follicules murins à des souris immunodéprimées

Jessica de Jesus Azevedo<sup>1</sup>, MC Chiti, MM Dolmans, R Orellana, M Soares, F Paulini, J Donnez, CA Amorim<sup>2</sup>

Promotrice : Pr. Marie-Madeleine Dolmans

FR

Un grand nombre de jeunes femmes atteintes d'une pathologie maligne peuvent être guéries par des traitements anti-cancéreux tels que la chimiothérapie, la radiothérapie et la greffe de moelle. Cependant ces traitements sont susceptibles de causer une infertilité (Larsen et al., 2003). Afin de pouvoir préserver la fertilité des patientes qui vont bénéficier d'un traitement anti-cancéreux, plusieurs techniques ont été mises au point. La cryopréservation de tissu ovarien est la seule technique envisageable pour la préservation de la fertilité des patientes prépubères et des patientes pour lesquelles le traitement anti-cancéreux doit être débuté dans l'immédiat. Le tissu ovarien peut être greffé ultérieurement à la patiente, lorsque celle-ci est guérie et qu'elle présente un désir de grossesse. Cependant, cette technique ne peut pas être appliquée lorsque la patiente a été atteinte d'une pathologie cancéreuse pour laquelle il y a un risque important de réimplantation de cellules malignes lors de la greffe du tissu ovarien (Dolmans et al., 2013). Afin d'éviter ce risque, l'équipe du laboratoire de recherche de gynécologie met au point un nouveau concept. Les follicules ovariens sont isolés de leur milieu environnant (par conséquent également des cellules malignes) et greffés dans une matrice créant ainsi un ovaire artificiel. L'ovaire artificiel peut être greffé chez la patiente, restaurant ainsi sa fertilité, sans risque.

Ce mémoire a pour objectif la participation à une étape de la création de l'ovaire artificiel.

La première étape pour l'ovaire artificiel était le développement d'une matrice 3-D afin de greffer les follicules isolés. Pour cela, différents polymères ont été testés. La fibrine a montré les meilleurs résultats en termes de taux de récupération des follicules après greffe, et vascularisation et dégradation de la matrice (Luyckx et al. 2014). Cependant, certaines données expérimentales restent à ce jour encore sans réponse, comme

par exemple le meilleur taux de récupération après greffe des follicules secondaires par rapport aux follicules primordiaux-primaires.

L'étude décrite dans ce mémoire fut réalisée dans le but de confirmer ces résultats et d'investiguer la raison pour laquelle les follicules secondaires semblent plus résistants que les follicules primordiaux-primaires. A cette fin, des ovaires de souris NMRI ont été utilisés pour isoler des follicules préantraux. Les follicules primordiaux-primaires furent séparés des follicules secondaires formant ainsi deux groupes de follicules qui furent greffés de part et d'autre de la paroi abdominale des souris immunodéprimées (SCID) par l'intermédiaire d'une matrice de fibrine (F12,5/T1). La greffe fut maintenue pendant 2 jours chez 5 souris et pendant 7 jours chez 6 souris. La densité folliculaire après récupération des greffons après 2 jours de greffe était de 16% dans le groupe des follicules primordiaux primaires et de 40% dans le groupe des follicules secondaires. La densité folliculaire après 7 jours de greffe était de 6% dans le groupe des follicules primordiaux-primaires et de 28% dans le groupe des follicules secondaires. Un nombre plus important de follicules secondaires par rapport aux follicules primordiaux-primaires a donc été retrouvé après les 2 périodes de greffe (23%, valeur  $p < 0,001$ ). Les follicules présents au sein des deux groupes avant la greffe avaient une bonne viabilité. Selon les résultats obtenus par la méthode TUNEL, il n'y a pas de différence entre les deux groupes en ce qui concerne l'apoptose folliculaire après la greffe. Une analyse par l'immunomarquage Ki67 a démontré que les follicules greffés sont capables de croître. Un nombre plus important de néovaisseaux a été mis en évidence par immunomarquage CD34 dans le groupe des follicules secondaires après 7 jours de greffe. La discussion de ces résultats et les perspectives futures sont également décrits dans ce mémoire.

# Fertility preservation in cancer patients: the artificial ovary. Allografting of murine follicles in immunocompromised mice

Thousands of women suffering from malignant diseases can now be treated by chemotherapy, radiotherapy or bone marrow transplantation, but these treatments are known to impair fertility (Larsen et al., 2003). Different techniques can, however, be used to preserve fertility in these women. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue is the only strategy that can be applied in prepubertal patients and women who need to start their cancer treatment immediately. Despite increasingly successful results, this technique cannot be implemented if the patient was affected by a disease that carries a high risk of transferring malignant cells while grafting the ovarian tissue (Dolmans et al., 2013). To avoid this risk, the Gynecology Research Unit is working on a new concept to restore fertility in cancer patients, involving isolation of ovarian follicles from their environment and hence from malignant cells, and grafting inside a matrix – essentially an ‘artificial ovary’.

The first step in creating an artificial ovary is development of a 3D matrix to graft isolated preantral follicles. To this end, different polymers have been tested, with fibrin yielding the best results so far in terms of follicle recovery rate, and matrix vascularization and degradation. However, some puzzling findings need to be addressed, such as the lower recovery rate of primordial-primary follicles compared to secondary follicles (Luyckx et al., 2014; Vanacker et al., 2014).

The goal of this study was to confirm these results and investigate why secondary follicles appear to be more resistant than primordial-primary follicles. Ovaries from NMRI mice were therefore used for isolation of preantral follicles. Primordial-primary follicles were separated from secondary follicles, forming two follicle groups, and then grafted to each side of the abdominal wall of SCID mice inside a fibrin matrix (F12.5/T1). The grafts were left in place for 2 days in 5 mice and 7 days in 6 mice. The follicle recovery rate was 16% in the primordial-primary group and 40% in the secondary group after 2 days of grafting, and 6% in the primordial-primary group and 28% in the secondary group after 7 days of grafting, confirming previous studies. Indeed, we found a higher recovery rate of secondary follicles than primordial-primary follicles after both periods of grafting (23%, p value <0.001), despite follicles from each group showing good viability prior to grafting. Follicle apoptosis after grafting was analyzed by TUNEL, which revealed no difference between the two groups. Follicle growth was assessed using the immunomarker Ki67, which indicated that grafted follicles from both groups were able to grow. Larger numbers of new vessels were identified by CD34 immunostaining in the secondary group after 7 days of grafting. These results are discussed and future prospects described in this dissertation.

## AFFILIATIONS

- <sup>1</sup> Larsen EC, Muller J, Schmieglow K, Rechnitzer C, Andersen AN. “Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer.” *J Clin Endocrinol Metab* 2003: 5307-5314.
- <sup>2</sup> Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Yding Andersen C and Greve T. “Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue.” *Fertil Steril* 2013: 1514-1522.
- <sup>3</sup> Luyckx V, Dolmans MM, Vanacker J, Legat C, Fortuno Moya C, Donnez J, Amorim CA. “A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold.” *Fertil Steril* 2014: 1140-1156.
- <sup>4</sup> Vanacker J, Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Amorim CA. “First transplantation of isolated murine follicles in alginate.” *Regen Med* 2014: 609-619.