

Cryoconservation des tissus testiculaires : Quel avenir ?

Lionel VAUDREUIL, Nathalie RIVES, Jean Pierre MILAZZO, Bertrand MACE

Laboratoire de Biologie de la Reproduction - CECOS, Rouen

RESUME

Une augmentation globale de l'incidence des cancers est observée depuis vingt ans chez l'adulte comme chez l'enfant. Cependant, les progrès réalisés dans la prise en charge diagnostique et thérapeutique de ces cancers ont transformé une maladie fatale en maladie curable. L'amélioration de l'efficacité des thérapeutiques passe par une augmentation de leur toxicité. Un grand nombre de complications ou séquelles peuvent survenir chez ces survivants guéris d'une affection maligne de l'enfance, parmi lesquelles les altérations du tissu gonadique sont de loin les plus fréquentes.

Chez la petite fille, la congélation du tissu ovarien est devenue une pratique accessible et l'utilisation du tissu ovarien par greffe semble ouvrir des perspectives intéressantes. Chez le garçon pubère, l'autoconservation de spermatozoïdes éjaculés est envisageable, alors qu'en cas d'échec ou d'impossibilité de réalisation de ce recueil mais aussi chez le garçon non pubère, une autre stratégie doit être mise en œuvre : le prélèvement chirurgical du tissu testiculaire et sa congélation.

Les protocoles de congélation des gamètes mâles matures éjaculés sont bien établis. Cette méthodologie a été transposée secondairement sur les spermatozoïdes prélevés au niveau de l'épididyme mais aussi extraits de fragments de tissu testiculaire. Cependant, la congélation du tissu testiculaire adulte entier est moins répandue. Les protocoles de congélation du sperme éjaculé ont été élaborés pour les spermatozoïdes et ne sont pas adaptés aux cellules germinales immatures, les spermatogonies. Ces cellules riches en cytoplasme présentent une certaine vulnérabilité à la congélation. Ainsi, les protocoles de congélation restent à définir tant sur la composition du milieu de congélation, les temps d'incubation dans ce milieu, la courbe de descente en température que sur les modalités de décongélation.

L'utilisation ultérieure du tissu testiculaire immature congelé définira la stratégie de congélation. Deux options peuvent être retenues : (i) la congélation du tissu testiculaire entier ou (ii) la congélation des spermatogonies en suspension. L'utilisation du tissu testiculaire

immature congelé pourra s'effectuer soit après maturation *in vitro* des cellules germinales, soit par transplantation des cellules germinales ou du tissu entier par greffe autologue voire suggéré par certains auteurs par xéno-greffe. Cependant, cette dernière approche soulève des questions à la fois éthiques et biologiques.

Mots clés : *cellules germinales, cryoconservation, fertilité, maturation in vitro, tissu testiculaire, transplantation*

I. INTRODUCTION

La spermatogenèse regroupe l'ensemble des événements qui, à partir des spermatogonies, vont permettre la production de gamètes matures haploïdes, les spermatozoïdes. Ce processus continu de la puberté à la sénescence se met en place entre le 6ème et le 7ème jour chez la souris et vers 12 ans chez l'homme [5].

Plusieurs types de spermatogonies peuvent être identifiées dans le testicule adulte, les spermatogonies de type A et les spermatogonies de type B. Dans certaines espèces, sont également rapportées des spermatogonies de type intermédiaire (In). Les spermatogonies de type A s'individualisent en deux catégories : les Ad (dark) à chromatine granuleuse foncée et les Ap (pâle) à chromatine fine dispersée. Les spermatogonies Ad sont considérées comme les cellules germinales souches, caractérisées par leur multipotence, leur capacité d'auto renouvellement, leur faible potentiel de prolifération cellulaire, une forte propension à l'évolution clonale et leur division asymétrique. Ces cellules évoluent dans un environnement protégé appelé "niche" [7].

Correspondance :

*Dr Nathalie RIVES - Laboratoire de Biologie de la Reproduction - CECOS, CHU Charles Nicolle, 76031 Rouen
Tél 02 32 88 82 25 - Fax 02 35 98 20 07 -
Email nathalie.rives@chu-rouen.fr*

Du point de vue embryologique, les spermatogonies souches sont issues des cellules germinales primordiales (CGPs) dérivant, elles-mêmes, de l'épiblaste. Après colonisation des crêtes génitales, les CGPs seront englobées par les cellules de Sertoli formant ainsi l'ébauche des cordons séminifères, délimités par une membrane basale. Les CGPs vont alors se différencier en préspermatogonies encore appelées gonocytes. Les gonocytes vont subir une période intense de prolifération cellulaire puis entrer dans une phase de quiescence, avant de se différencier en spermatogonies; cette différenciation survient entre la naissance (la souris) et la puberté (l'homme) [7].

La cryoconservation du tissu testiculaire peut donc intéresser théoriquement un tissu à différents stades de maturité, immature prépubère ou mature chez l'adolescent ou l'adulte. Ainsi, dans la majorité des cas, la congélation du tissu testiculaire mature est proposée dans un contexte d'infertilité et s'intègre dans un projet à court terme de paternité. Il semble tout à fait envisageable de proposer la congélation de ce tissu testiculaire mature pour répondre aussi à un projet à long terme de paternité chez des adultes jeunes ou adolescents pubères présentant une pathologie connue comme étant à risque d'infertilité. Il s'agirait bien entendu de patients pour lesquels une azoospermie non obstructive aurait été confirmée, en supposant que la réalisation d'une biopsie testiculaire très tôt augmenterait leur chance de retrouver des spermatozoïdes : infertilité congénitale (hypogonadisme hypogonadotrope, syndrome de Klinefelter, sujet porteur de microdélétions du chromosome Y...), infertilité acquise (traitements gonadotoxiques). En revanche, la congélation du tissu testiculaire immature s'inscrit dans un projet à long terme de paternité et s'adresse à une population masculine à spermatogenèse non encore établie, présentant un risque élevé d'infertilité le plus souvent acquise et secondaire à des traitements gonadotoxiques.

II. EFFET DES TRAITEMENTS ANTI-CANCEREUX SUR LA SPERMATOGENESE

Différents facteurs, congénitaux ou externes, sont susceptibles d'altérer la spermatogenèse, parmi lesquels on peut retenir les traitements anticancéreux. Effectivement, les effets délétères de la chimiothérapie et/ou de la radiothérapie sur le testicule adulte sont maintenant bien connus avec pour conséquence un arrêt de la spermatogenèse transitoire ou définitive. En revanche, les effets de ces traitements sur le testicule prépubère ne sont pas parfaitement identifiés or les cancers de l'enfant de moins de 15 ans représentent 1% de l'ensemble des cancers. L'augmentation de l'efficacité des thérapies anticancéreuses s'accompagne d'une augmentation de leur toxicité (effet dose), avec une cible de choix, les gonades, le testicule étant plus vulnérable que l'ovaire.

Les lésions gonadiques peuvent intéresser à la fois les cellules de la lignée germinale et les cellules somatiques et sont variables en fonction du traitement (pour revue voir [15]). A partir de 0,1 Gy, une irradiation testiculaire peut altérer l'épithélium séminifère et au-delà de 20 Gy des lésions permanentes des cellules de Leydig peuvent être

associées [21, 18]. De plus, moins de 2% des enfants ayant subi une irradiation corporelle totale, telle réalisée avant la greffe de moelle, sont encore fertiles à l'âge adulte. La toxicité gonadique des traitements chimiothérapeutiques va dépendre des molécules utilisées, de la dose, de la durée mais aussi de la susceptibilité individuelle. Cependant, les agents alkylants (cyclophosphamide, chlorambucil...) mais aussi les antimétabolites (cytosine-arabine...) sont connus pour leur effet toxique à long terme sur les cellules germinales.

Il est possible d'identifier certaines situations, à risque très élevé d'altération de la fertilité à l'âge adulte [16] : l'irradiation corporelle totale avant greffe de moelle, la chimiothérapie de conditionnements avant greffe de moelle, la radiothérapie pelvienne et/ou testiculaire, les tumeurs des tissus mous métastatiques et la maladie de Hodgkin avec utilisation d'agents alkylants notamment le melphalan dans le protocole MOPP [23, 4]. Il subsiste cependant de grandes incertitudes pour bon nombre de traitements car les protocoles thérapeutiques sont en perpétuelle évolution avec l'utilisation fréquente de nouvelles molécules dont la toxicité sur la fonction de reproduction n'est pas encore clairement établie.

La guérison de ces enfants doit s'associer à la mise au point de stratégies de préservation de leur fertilité. Chez la petite fille, la congélation et la conservation du tissu ovarien peut être proposée. Chez le garçon pubère, des spermatozoïdes isolés du sperme ou des urines peuvent être congelés [2] alors que la conservation du tissu testiculaire immature n'est actuellement pas proposée dans la majorité des pays chez le garçon prépubère.

III. CONGELATION DU TISSU TESTICULAIRE MATURE ET IMMATURE

La congélation du tissu testiculaire mature s'est particulièrement développée chez l'homme depuis l'introduction de nouvelles techniques d'Assistance Médicale à la Procréation, comme l'injection de spermatozoïdes dans le cytoplasme ovocytaire (ICSI).

Le tissu testiculaire mature est congelé d'emblée ou après dilacération mécanique et/ou enzymatique afin d'obtenir une suspension cellulaire. Les protocoles de congélation sont validés depuis longtemps et ont pour principal objectif la congélation et la préservation des spermatozoïdes, cellules pauvres en cytoplasme. Ils consistent schématiquement en une équilibration des spermatozoïdes avec une solution contenant un cryoprotecteur pénétrant, le plus souvent du glycérol, avec ou sans addition de jaune d'œuf, suivie d'une congélation contrôlée rapide dans des paillettes [14, pour revue voir 15].

Le tissu testiculaire immature est constitué de cellules riches en cytoplasme, principalement les spermatogonies, les cellules de Sertoli et de Leydig, donc plus vulnérables à la congélation. En effet, ces cellules possèdent une quantité d'eau intracellulaire élevée, accroissant le risque de formation de cristaux de glace intracytoplasmique.

La congélation est une étape délicate car elle soumet les cellules à un grand nombre d'altérations potentielles que sont la destruction des organites intracellulaires par la formation de cristaux de glaces intracellulaires, la déshydratation trop importante des cellules entraînée par l'effet solution qui correspond à une rééquilibration osmotique du milieu suite à la formation de glace extracellulaire, la caléfaction liée au phénomène de surfusion (solidification à des températures inférieures au point de solidification de l'eau) et la désorganisation du cytosquelette souvent délétère voire létale pour la cellule provoquée par l'exposition des cellules à de basses températures [pour revue voir 25].

Pour limiter ces risques de lésions, il est important de définir trois points importants dans un protocole de congélation:

1. Le premier point consiste à définir un milieu de congélation dans lequel seront équilibrés les échantillons à congeler. Ce milieu contiendra un cryoprotecteur qui va limiter la formation de cristaux de glace intra et extracellulaires. Les cryoprotecteurs pénétrants tels que le DMSO (diméthylsulfoxyde), le glycérol ou le 1,2-propanediol limiteront la formation de cristaux de glace intracellulaires et pourront ou non être associés à des cryoprotecteurs non pénétrants tels que le sucre, le sérum de veau foetal ou le ficoll réduisant la formation de cristaux de glace extracellulaires.

La congélation de spermatogonies isolées de testicules pubères et prépubères est possible dans du DMSO, à la fois chez la souris [1] et l'homme [12]. La viabilité cellulaire post-décongélation ne semble pas être influencée par le type de cryoprotecteur utilisé (DMSO, glycérol ou 1,2-propanediol) [12]. Cependant, le DMSO semble plus efficace que le glycérol dans la préservation de la viabilité post-décongélation des spermatogonies A bovines purifiées [10]. De plus, l'adjonction de sucre à une concentration de 0,07M accroît l'effet cryoprotecteur du milieu sur les cellules germinales [10, 8]. Frederickx et al. [8] démontrent la supériorité du DMSO sur l'éthylène glycol lors de la congélation de spermatogonies isolées de testicules prépubères murins.

2. Dans un deuxième temps, il est important de définir un temps d'incubation dans le cryoprotecteur car de ce temps, va dépendre la pénétration du cryoprotecteur dans la cellule. Une pénétration trop faible du cryoprotecteur n'empêchera pas efficacement la formation de cristaux de glace, au contraire, une pénétration trop importante de celui-ci sera délétère pour la cellule soit directement par son effet toxique, soit indirectement par une déshydratation excessive secondaire aux modifications osmotiques du milieu [pour revue voir 25].

3. Enfin il est nécessaire de définir la courbe de descente en température, pouvant être contrôlée ou non, lente ou rapide, associée ou non à un "seeding". Une descente rapide de la température va limiter l'effet solution mais induire la formation de cristaux de glace. Une descente lente de la température va réduire la formation de ces cristaux. Le "seeding" consiste à refroidir très rapide-

ment l'échantillon aux alentours de la température de cristallisation dans le but de limiter les effets thermiques de la surfusion.

Après décongélation d'une suspension de spermatogonies murines, les meilleures viabilités sont obtenues pour des courbes de descente en température non linéaires et contrôlées [13, 12, 11] avec "seeding" généralement entre -6 et -7°C. Il en est de même pour la congélation du tissu testiculaire entier prépubère de rongeurs et de primates [19, 17]. Cependant, une survie satisfaisante des spermatogonies de souris [11] ou bovines [10] est observée après une descente en température non linéaire et non contrôlée en plaçant directement les échantillons à -80°C pendant 24 heures avant de les plonger dans l'azote liquide. Une descente en température non contrôlée ne modifie pas la viabilité par comparaison à une courbe contrôlée pour deux protocoles identiques [10].

Les résultats de ces différentes études ne permettent pas pour l'instant de définir les conditions optimales de congélation du tissu testiculaire prépubère, à la fois dans les modèles animaux mais aussi chez l'homme.

IV. UTILISATION DU TISSU TESTICULAIRE

La congélation du tissu testiculaire humain immature ne peut s'envisager que si une utilisation ultérieure de ce tissu est possible, trois grandes voies d'utilisation peuvent être retenues :

1. La maturation *in vitro* des cellules testiculaires

Dans des modèles animaux et chez l'homme, une étape spécifique de la spermatogenèse a été réalisée *in vitro*. La maturation de cellules germinales humaines en spermatides ronds peut être obtenue, en deux jours, par la coculture simple des cellules germinales et des cellules de Sertoli en "cluster" [22]. Une maturation moins rapide mais présentant moins d'anomalies au niveau des spermatides peut être obtenue par la coculture sur membrane des cellules testiculaires de souris [9]. Mais actuellement aucun système ne permet d'obtenir une spermatogenèse complète et dans le meilleur des cas, on ne peut qu'en observer les premières étapes [24].

2. La transplantation de cellules germinales

La greffe allogénique (souris-souris) de cellules germinales murines dans le testicule d'une souris dépourvue de spermatogenèse va induire la reprise de la spermatogenèse, grâce aux propriétés de cellules souches des spermatogonies A [3]. Il est aussi possible de réaliser, sur le même principe, des xéno greffes entre rat et souris avec le même succès [6]. Cependant si on s'éloigne entre espèces donneuse et receveuse, les résultats sont plus mitigés. La greffe de spermatogonies de hamster chez la souris assure une reprise satisfaisante de la spermatogenèse mais une production de spermatozoïdes anormaux laissant supposer l'intervention de communications intercellulaires espèce-dépendantes entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales [13]. De plus, la greffe de spermatogonies

humaines dans des testicules de souris permet la survie des spermatogonies sans reprise de la spermatogenèse [12].

3. La greffe de tissu testiculaire

La greffe de tissu testiculaire de souris montre une parfaite reprise de la spermatogenèse chez des souris traitées au busulfan [19]. De même, la xéno greffe de tissu testiculaire de lapin chez la souris aboutit à une bonne reprise de la spermatogenèse. Des naissances ont pu être obtenues par ICSI après prélèvement de spermatozoïdes de lapin chez les souris greffées [19]. Une reprise de la stéroïdogenèse et de la spermatogenèse est obtenue après la greffe de tissu testiculaire chez des animaux préalablement castrés tels que la souris, le hamster et le singe [17]. Très récemment, le même résultat a été rapporté après greffe de tissu testiculaire immature de chat chez des souris castrées [20].

V. CONCLUSION

Si jusqu'à ce jour, la plupart des études réalisées porte sur l'utilisation du tissu testiculaire prépubère afin d'établir une spermatogenèse *in vitro* (maturation *in vitro*) ou *in vivo* (greffe de cellules ou de tissu testiculaires), peu d'études se sont intéressées à la validation de protocoles de congélation de spermatogonies souches et/ou de tissu testiculaire prépubère. La stratégie envisageable est la congélation d'un large fragment testiculaire voire d'un testicule entier afin de préserver les interactions entre les spermatogonies souches et les cellules somatiques mais aussi de conserver le micro-environnement indispensable à la survie de ces cellules germinales. De plus, cette stratégie ne limite pas les voies d'utilisation ultérieure.

RÉFÉRENCES

1. AVARBOCK M.R., BRINSTER C.J., BRINSTER R.L. : Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat. Med.*, 1996, 2 : 693-696.
2. BAHADUR G., LING K.L., HART R. et al. : Semen quality and cryopreservation in adolescent cancer patients. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 3157-3161.
3. BRINSTER R.L., ZIMMERMANN J.W. : Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1994, 91 : 11298-11302.
4. 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 : 325-337.
5. CLERMONT Y. : Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.*, 1972, 52 : 198-236.
6. CLOUTHIER D.E., AVARBOCK M.R., MAIKA S.D., HAMMER R.E., BRINSTER R.L. : Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature*, 1996, 381 : 418-421.
7. DE ROOIJ D.G., GROOTEGOED J.A. : Spermatogonial stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998, 10 : 694-701.
8. FREDERICKX V., MICHIELS A., GOOSSENS E. et al. : Recovery, survival and functional evaluation by transplantation of frozen-thawed mouse germ cells. *Hum. Reprod.*, 2004, 19 : 948-953.
9. HUE D., STAUB C., PERRARD-SAPORI M.H. et al. : Meiotic differentiation of germinal cells in three-week cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules. *Biol. Reprod.*, 1998, 59 : 379-387.
10. IZADYAR F., MATTHIJS-RIJSENBILT J.J., DEN OUDEN K. et al. : Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *J. Androl.*, 2002, 23 : 537-545.
11. KANATSU-SHINOHARA M., OGONUKI N., INOUE K. et al. : Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum. Reprod.*, 2003, 18 : 2660-2667.
12. NAGANO M., PATRIZIO P., BRINSTER R.L. : Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertil. Steril.*, 2002, 78 : 1225-1233.
13. OGAWA T., DOBRINSKI I., AVARBOCK M.R., BRINSTER R.L. : Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat. Med.*, 2000, 6 : 29-34.
14. RIVES N., SIBERT L., CLAVIER B., DELABROYE V., MARPEAU L., MACE B. : Full-term delivery following intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed immotile testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 3399-3401.
15. RIVES N., MACE B. : Cryoconservation du tissu testiculaire chez l'enfant : comment préserver la fertilité chez le jeune garçon ? *Andrologie*, 2004, 14 : 404-411.
16. SANDERS J.E., HAWLEY J., LEVY W. et al. : Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood*, 1996, 87 : 3045-3052.
17. SCHLATT S., KIM S.S., GOSDEN R. : Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. *Reproduction*, 2002, 124 : 339-346.
18. SHALET S.M., TSATSOUKIS A., WHITEHEAD E., READ G. : Vulnerability of the human Leydig cell to radiation damage is dependent upon age. *J. Endocrinol.*, 1989, 120 : 161-165.
19. SHINOHARA T., INOUE K., OGONUKI N. et al. : Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 3039-3045.
20. SNEDAKER A.K., HONARAMOOZ A., DOBRINSKI I. : A game of cat and mouse : xenografting of testis tissue from domestic kittens results in complete cat spermatogenesis in a mouse host. *J. Androl.*, 2004, 25 : 926-930.
21. SPEISER B., RUBIN P., CASARETT G. : Aspermia following lower truncal irradiation in Hodgkin's disease. *Cancer*, 1973, 32 : 692-698.
22. TESARIK J., GUIDO M., MENDOZA C., GRECO E. : Human spermatogenesis in vitro : respective effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis, and Sertoli cell apoptosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998, 83 : 4467-473.
23. THOMSON A.B., CRITCHLEY H.O., WALLACE W.H. : Fertility and progeny. *Eur. J. Cancer*, 2002, 38 : 1634-1644.
24. VIGIER M., WEISS M., PERRARD M.H., GODET M., DURAND P. : The effects of FSH and of testosterone on the completion of meiosis and the very early steps of spermiogenesis of the rat: an in vitro study. *J. Mol. Endocrinol.*, 2004, 33 : 729-742.
25. WOELDERS H., CHAVEIRO A. : Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes. *Cryobiology*, 2004, 49 : 258-271.

ABSTRACT

What is the future of testicular tissue cryoconservation?

Lionel VAUDREUIL, Nathalie RIVES,
Jean Pierre MILAZZO, Bertand MACE

Over the last twenty years, an increased incidence of cancer has been observed in the population of adolescents and young adults. With the progress in cancer diagnosis and therapy, childhood cancer has become a curable disease. The efficacy of treatment is associated with a high degree of toxicity and gonadal function is particularly sensitive to this toxicity. Prevention of sterility in childhood cancer survivors will become a major challenge in reproductive medicine.

Cryopreservation of ovarian tissue is performed in girls and women before cancer treatment. Cryopreservation of ejaculated spermatozoa is possible in sexually mature boys. However, for prepubertal boys or after failure of ejaculated sperm collection, mature or immature testicular tissue banking should be proposed. However, an optimal cryopreservation protocol is a prerequisite for clinical applications. Furthermore, the future applications of immature testicular tissue banking should be developed, not solely autologous testicular tissue grafting, but also in vitro maturation of germ cells. Cryopreservation protocols, transplantation and in vitro maturation techniques should be improved in animal models and in humans.

Key words: *germ cells, cryopreservation, fertility, maturation in vitro, testicular tissue, transplantation*