

Cryoconservation du tissu testiculaire chez l'enfant : comment préserver la fertilité chez le jeune garçon ?

Nathalie RIVES, Bertrand MACÉ

Laboratoire de Biologie de la Reproduction - CECOS, CHU Charles Nicolle, Rouen

RESUME

La prise en charge thérapeutique des cancers de l'enfant s'est considérablement améliorée depuis les trente dernières années avec un taux de survie à long terme atteignant les 70%. Cependant, l'amélioration de l'efficacité thérapeutique s'associe à une augmentation des effets indésirables. Parmi les effets morbides, la toxicité sur le tissu gonadique est la plus fréquemment rencontrée et peut entraîner une stérilité définitive à l'âge adulte.

La préservation de la fertilité de l'enfant doit être envisagée avant le début des traitements. Ainsi, chez la petite fille, la congélation et conservation du tissu ovarien s'est mise en place en France depuis quelques années. Chez le jeune garçon pubère, il est possible de proposer une autoconservation de spermatozoïdes obtenus dans un recueil après masturbation.

Cependant, chez le garçon pré pubère ou en cas d'échec au recueil de sperme, une autre stratégie de prise en charge doit être envisagée, elle implique en premier lieu le prélèvement chirurgical du tissu testiculaire avec deux options possible : i) la congélation du tissu testiculaire entier ou ii) la congélation de cellules germinales immatures et/ou de cellules germinales matures (spermatozoïdes).

L'utilisation ultérieure du tissu testiculaire immature cryoconservé pourra s'effectuer soit après maturation *in vitro* des cellules germinales (spermatogenèse *in vitro*), soit par transplantation des cellules germinales par greffe autologue voire xéno greffe. Le risque de la greffe autologue est la réintroduction de l'affection maligne chez le patient, alors que la xéno greffe élimine ce risque. Cependant, cette dernière approche soulève d'autres interrogations à la fois d'ordre éthique et biologique.

Mots clés : cancer de l'enfant, cellules germinales, cryoconservation, fertilité, maturation *in vitro*, transplantation

I. INTRODUCTION

Les cancers de l'enfant de moins de 15 ans représentent 1% de l'ensemble des cancers. Bien que les cancers de l'enfant soient des maladies rares, avec environ 1800 à 2000 nouveaux cas par an, ils représentent la première cause de décès par maladie avant l'âge de 15 ans. 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%. De plus, une augmentation d'environ 25% de l'incidence du cancer a été observée en France chez les adultes comme chez les enfants entre 1975 et 1998 avec une certaine stabilisation depuis 1990 [43, 54].

Les cancers de l'enfant diffèrent de ceux de l'adulte par i) leurs types : 30% d'hémopathies malignes, avec en tête de liste la leucémie aiguë lymphoblastique, et 70% de tumeurs solides parmi lesquelles les tumeurs du système nerveux central sont les plus fréquentes [5, 6, 54], ii) leur chimio-sensibilité, et iii) leur évolution. Les progrès réalisés dans la prise en charge diagnostique et thérapeutique de ces cancers ont transformé une maladie fatale en maladie curable pour la majorité des enfants. Ainsi, les taux de survie se sont améliorés considérablement et la guérison est aujourd'hui devenue un objectif réaliste. En Europe du Nord et en Amérique du Nord, ce taux de guérison était de 25-30% en 1970 et atteint 70-80% en 2001 [4, 32]. A long terme, on peut estimer qu'en 2010, un adulte sur 715 aura été traité pour un cancer durant l'enfance [9].

Correspondance :

Dr Nathalie RIVES - Laboratoire de Biologie de la Reproduction - CECOS, CHU Charles Nicolle, 1 rue de Germont, 76031 Rouen - Tel 02.32.88.82.25 - Fax 02.35.98.20.07 - Email nathalie.rives@chu-rouen.fr

Cependant, un grand nombre de complications ou séquelles peuvent survenir chez ces survivants guéris d'une affection maligne de l'enfant. Ces séquelles sont extrêmement variables dans leur type, leur intensité et leur retentissement sur la qualité de vie, parmi lesquelles on citera les séquelles neurologiques et neuropsychiques, les perturbations endocriniennes, les altérations de la croissance, les lésions cardiaques, les néoplasies secondaires mais aussi les altérations de la fonction de reproduction, bien souvent oubliées comme séquelles éventuelles de ces traitements [9, 39].

L'augmentation de l'efficacité des traitements s'accompagne d'une augmentation de leur toxicité, avec une cible de choix de cette toxicité, 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 varient en fonction des thérapeutiques mises en œuvre (type, dose, durée). Ainsi, une radiothérapie pelvienne ou testiculaire directe comprise entre 0,1 et 1,2 Gy peut possiblement altérer l'épithélium séminifère [10, 11]. Une irradiation comprise entre 1,2 et 4 Gy entraîne une altération définitive de l'épithélium séminifère [55], et au-delà de 20 Gy des lésions permanentes des cellules de Leydig [50].

De plus, moins de 2% des enfants ayant subi une irradiation corporelle totale, telle réalisée avant la greffe de moelle, sont fertiles à l'âge adulte [45]. De même, une irradiation cérébrale comprise entre 35 et 45 Gy altère l'axe hypothalamo-hypophysaire avec défaut de production des gonadotrophines hypophysaires [27]. La toxicité gonadique des traitements par chimiothérapie va dépendre des molécules utilisées, de la dose, de la durée mais aussi de la susceptibilité individuelle. Cependant, les agents alkylants (cyclophosphamide, chlorambucile...) mais aussi les antimétabolites (cytarabine...) sont connus pour leur effet toxique à long terme ou permanent sur les cellules germinales [9].

Il est possible d'identifier certaines situations, à risque très élevé d'altération de la fertilité à l'âge adulte : l'irradiation corporelle totale avant greffe de moelle, la chimiothérapie préparatrice avant greffe de moelle, la radiothérapie pelvienne et/ou testiculaire, les tumeurs des tissus mous métastatiques et la maladie de Hodgkin avec utilisation comme agents antimétabolites des alkylants [61, 9]. Il subsiste cependant de grandes incertitudes pour bon nombre de traitements car les protocoles thérapeutiques mis en œuvre sont en perpétuelle évolution avec l'introduction fréquente de nouvelles molécules dont les effets toxiques sur la fonction de reproduction ne sont pas toujours ou encore clairement établis.

Il semble difficilement envisageable d'assurer la guérison de ces enfants sans mettre en œuvre des stratégies pour préserver leur fertilité. Chez la petite fille, la congélation et la conservation du tissu ovarien se sont développées depuis quelques années alors que cette démarche de conservation du tissu testiculaire immature est à l'état de prémices dans la majorité des pays.

II. COMMENT PRÉSERVER LA FERTILITÉ CHEZ LE JEUNE GARÇON ET L'ADOLESCENT ?

La spermatogenèse est un processus continu de la puberté à la naissance. L'initiation de la spermatogenèse intervient entre l'âge de 10 et 12 ans, et dès lors, on peut observer dans les tubes séminifères des spermatozoïdes primaires en grand nombre qui vont spontanément dégénérer ou progresser jusqu'au stade de spermatides. Les spermatides produites sont qualitativement non satisfaisantes et dégénèrent également [33]. Une production de spermatozoïdes qualitativement et quantitativement satisfaisante intervient en moyenne entre 13 et 14 ans chez le garçon. On peut cependant observer des initiations spontanées de la spermatogenèse en dehors de la puberté chez le jeune garçon. Le processus s'arrête en général au stade de spermatozoïdes secondaires [38]. L'épithélium séminifère d'un garçon non pubère contient en général des cellules de Sertoli immatures et des spermatogonies (spermatogonies souches et spermatogonies différenciées) [38]. Ainsi, les stratégies pour préserver la fertilité du garçon seront différentes en fonction de la possibilité ou non de recueillir des gamètes matures.

1. Les stratégies validées

Les stratégies validées s'adressent aux garçons adolescents pubères ou en péri puberté chez lesquels il est possible d'isoler des spermatozoïdes dans le sperme ou dans les urines [2, 3, 34, 42]. Dans une étude rétrospective de 1991 à 2000, Bahadur et coll. [2] ont effectué une congélation de spermatozoïdes éjaculés chez 86,1% des adolescents consultant pour autoconservation de sperme avant traitement anticancéreux. La qualité spermatique était compatible avec une utilisation ultérieure dans le cadre d'une Assistance Médicale à la Procréation. Si l'adolescent échoue dans la réalisation de son recueil de sperme, une recherche de spermatozoïdes dans les urines doit être envisagée. Dans la mesure où le fait d'être accompagné par l'un des parents semble augmenter le risque d'échec au recueil (29,7% dans le groupe "adolescents accompagnés" versus 8,0% dans le groupe "adolescents non accompagnés"), l'adolescent pourra aussi revenir seul pour tenter d'obtenir un recueil de sperme éjaculé [3]. L'échec au recueil peut aussi s'expliquer par une défaillance érectile qui peut être compensée ou améliorée par l'introduction d'un traitement pharmacologique.

Cependant, en l'absence d'obtention de spermatozoïdes éjaculés, l'alternative est aussi d'avoir recours à l'éjaculation provoquée par électrostimulation sous anesthésie générale. Cependant, cette pratique reste limitée, elle est évoquée dans les publications ou rapportée uniquement sous forme de "case reports" [19, 49, 61]. Enfin, on ne peut écarter la réalisation d'une ponction épидидymaire isolée et/ou associée à une biopsie testiculaire avec extraction de spermatozoïdes. Cette dernière approche est largement validée chez l'homme adulte depuis l'introduction de l'injection de spermatozoïdes dans le cytoplasme ovocytaire (ICSI) et est transposable chez l'adolescent. Cependant, ces deux dernières approches méritent réflexion car elles

nécessitent la réalisation d'un acte médical supplémentaire chez des patients qui, du fait de leur cancer, subissent déjà de multiples et lourdes explorations. De même, il faut tenir compte des répercussions psychologiques de ce geste complémentaire.

2. Les stratégies expérimentales

Ces stratégies expérimentales sont envisageables chez le jeune garçon avant la puberté. Elles visent à protéger les cellules germinales immatures *in vivo* à l'aide d'un traitement médical ou *in vitro* après prélèvement et congélation.

a) Le traitement médical de protection

Le traitement médical de protection a pour objectif d'inhiber l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique en émettant l'hypothèse que la mise au repos de cet axe puisse protéger les cellules germinales de l'effet délétère des traitements antimitotiques. Cette hypothèse semble plus adaptée au testicule adulte que celui du garçon pré pubère, dans la mesure où la régulation de la spermatogenèse par les gonadotrophines hypophysaires est réellement effective après la puberté.

Cette action protectrice de l'inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysio gonadique s'est vérifiée chez l'animal et plus spécifiquement chez le rat. L'inhibition chez le rat des sécrétions de FSH et de testostérone, avant et pendant le traitement antimitotique afin de protéger les cellules germinales survivantes, a un effet protecteur variable d'un traitement à l'autre [31]. Dans cette situation, le traitement protecteur agit plutôt en améliorant les capacités du testicule à maintenir une différenciation satisfaisante des spermatogonies de type A [30]. De plus, l'inhibition des sécrétions de testostérone et de FSH, par injection de testostérone ou d'agoniste du GnRH, instaurée immédiatement après irradiation ou injection de procarbazine améliore la réinitiation de la spermatogenèse, ce même effet est observé avec les antagonistes du GnRH. Les finalités de ces traitements sont de réduire les concentrations intratesticulaire de testostérone et plasmatique de FSH qui, si elles sont maintenues dans des valeurs physiologiques chez des rats irradiés ou soumis à un traitement antimitotiques, empêcheraient la différenciation des spermatogonies A ou amplifieraient le processus d'apoptose dans ces mêmes cellules [31]. Cependant, chez l'homme, l'administration de testostérone ou d'agonistes du GnRH ne donne pas de résultats concluants, ceci pouvant s'expliquer par des mécanismes différents de régulation de la spermatogenèse entre le rat et les primates [31, 61].

b) La conservation du tissu testiculaire immature

Théoriquement, il est possible d'envisager de prélever chirurgicalement du tissu testiculaire chez le jeune garçon avant de débiter les traitements anticancéreux à risque élevé de toxicité gonadique. Ce tissu testiculaire pourra être congelé d'emblée ou après dilacération mécanique et enzymatique afin d'obtenir une suspension de cellules germinales [9, 19, 61] Cette possibilité de congeler du tissu testiculaire se base sur les résultats obtenus après congélation du tissu testiculaire ou des cellules germinales en suspension chez l'homme adulte et leur utilisation ultérieure en ICSI.

Ainsi, dans le cadre d'azoospermie obstructive ou non obstructive, des grossesses et/ou naissances ont été rapportées après microinjection de spermatozoïdes testiculaires [44], de spermatides allongées [16], de spermatides rondes [58] et de spermatocytes secondaires [53]. Les protocoles de congélation des gamètes mâles matures qu'ils soient testiculaires ou éjaculés sont bien établis ; cependant, en ce qui concerne les cellules germinales immatures, les protocoles restent à définir tant sur la composition du milieu de congélation, les temps d'incubation dans le milieu de congélation, la courbe de descente en température et la durée du cycle de congélation. En effet, chez le garçon non pubère, la congélation va intéresser des cellules germinales diploïdes (les spermatogonies), riches en cytoplasme, plus vulnérables que les spermatozoïdes au processus de congélation-décongélation. Ces cellules présentent un risque accru de formation de cristaux de glace dans le cytoplasme lors de la décongélation avec pour conséquence une lyse cellulaire plus importante.

Trois stratégies peuvent être envisagées :

- La première consiste à prélever le tissu testiculaire et le congeler en petits fragments. Différents cryoprotecteurs ont été utilisés chez l'homme et chez la souris : le glycérol (10%) additionné de jaune d'œuf, le glycérol (10%) complété de sérum et du milieu de culture, le propanediol (1,5mM) additionné de sucrose (0,1M), [1, 21]. Hovatta et coll. [21] recommanderaient le propanediol comme cryoprotecteur avec un protocole de congélation comparable à celui utilisée pour la cryoconservation du tissu ovarien [20]. Cette approche maintient les spermatogonies souches dans leurs "niches".
- La deuxième stratégie consiste à préparer une suspension de cellules germinales à partir du tissu testiculaire. Cette suspension est obtenue après dilacération mécanique puis enzymatique par la collagénase. Cette approche méthodologique a été rapportée chez l'homme [8], la souris [17] et le veau [23]. Les cryoprotecteurs utilisés sont également variables : il peut s'agir de l'éthylène glycol, du propanediol, du glycérol et du diméthyl sulphoxide (DMSO) [8, 23, 17]. De même, les temps d'incubation dans le milieu cryoprotecteur, la courbe de descente en température ainsi que la méthodologie utilisée pour évaluer la viabilité des cellules germinales après décongélation varient d'une étude à l'autre. Le traitement par la collagénase préalablement à la congélation peut altérer la viabilité des cellules germinales et réduire leur résistance au processus de congélation-décongélation. De plus, les spermatogonies souches ne sont plus maintenues dans leur "niche". Dans ce contexte, la congélation du tissu testiculaire entier semblerait donc préférable.
- Une troisième stratégie est envisageable : l'utilisation des deux stratégies précédentes pour chaque prélèvement testiculaire dans la mesure où aucune d'entre elles n'est validée à l'heure actuelle.

Les protocoles de préparation et de congélation du tissu testiculaire immature doivent être déterminés et évalués sur les modèles animaux avant leur utilisation sur le tissu testiculaire immature chez le jeune garçon.

III. QUELLES UTILISATIONS ULTERIEURES SONT ENVISEAGEABLES POUR LE TISSU TESTICULAIRE IMMATURE OU LES CELLULES GERMINALES IMMATURES CRYOCONSERVEES ?

Le développement de stratégies de conservation du tissu testiculaire et des cellules germinales immatures implique des méthodologies nouvelles d'utilisation de ce tissu ou de ces cellules, qu'il s'agisse de la maturation ou culture *in vitro* des cellules germinales, de la transplantation de ces cellules germinales ou de la transplantation du tissu testiculaire.

1. La maturation ou culture *in vitro* des cellules germinales

a) La spermatogenèse *in vitro*

Le principe de cette approche est de pouvoir élaborer *in vitro* des gamètes mâles haploïdes, les spermatozoïdes, à partir des spermatogonies et dans le contexte de la conservation du tissu testiculaire immature, cette spermatogenèse serait établie à partir de spermatogonies cryoconservées et décongelées. La durée normale de la spermatogenèse est de 74 jours chez l'homme et constitue à l'heure actuelle un obstacle à la réalisation effective d'une spermatogenèse complète *in vitro*. Différentes études récentes rapportent, dans des modèles animaux et chez l'homme, la réalisation *in vitro* d'une étape spécifique de la spermatogenèse. Ainsi, la réalisation partielle ou complète du processus méiotique a été rapportée chez le rat [22, 57], le taureau [41] mais aussi chez l'homme [59, 60]. La différenciation *in vitro* de spermatides rondes en spermatides allongées a également été obtenue chez l'homme [13] avec une réduction de la durée de la spermiogenèse. Tesarik et coll. [59] reproduisent *in vitro* non seulement le processus méiotique mais semblent aussi obtenir des spermatides rondes en 24 heures, alors que cette étape dure en moyenne 20 à 22 jours *in vivo*. Cependant, ces études restent ponctuelles et leur rendement, en terme de cellules haploïdes produites, reste faible. Ainsi, les spermatozoïdes élaborés *in vitro* ne seraient utilisables qu'en ICSI. Cette méthodologie est envisageable pour les étapes tardives de la spermatogenèse mais il ne semble pas possible dans un futur proche d'envisager une transformation complète *in vitro* de spermatogonies en spermatozoïdes.

b) La culture *in vitro* des spermatogonies avant transplantation

Les spermatogonies, cellules germinales diploïdes situées à la périphérie des tubes séminifères, se répartissent en deux catégories principales : les spermatogonies A et B. Seules les spermatogonies de type A ont les propriétés de cellules souches. Les cellules souches se définissent par leur capacité à produire des lignées cellulaires différenciées spécifiques. Il existe deux principales sources de cellules souches : les cellules souches adultes (hématopoïétiques, neuronales, spermatogonies A) et les cellules souches embryonnaires (ES [embryonic stem cells] et EG [cellules

souches germinales embryonnaires]). Les cellules souches embryonnaires des premières divisions blastomériques sont totipotentes, capables de générer tous les types cellulaires y compris les cellules extra embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires situées au niveau de la masse cellulaire interne du blastocyste sont pluripotentes, capables de se différencier dans tous les types cellulaires d'un individu. Les spermatogonies de type A sont des cellules souches adultes multipotentes, capables de générer un nombre restreint de types cellulaires. Les cellules souches, quelque soit leur type, ont un faible indice de prolifération cellulaire, un fort potentiel à générer des clones cellulaires et sont situées dans un environnement protégé, appelé "niche" [29, 56].

Le nombre de spermatogonies souches est faible avec environ 20 à 30000 spermatogonies A par testicule [14]. Leur culture *in vitro* a pour but d'obtenir une fraction enrichie en spermatogonies souches [26, 28, 47, 48] et doit s'associer à une identification spécifique de ces cellules. Cette identification peut-être réalisée à l'aide de critères morphologiques dont le rendement est médiocre, une séparation cellulaire par gradient de densité [29], des critères moléculaires à l'aide de marqueurs de surface exprimés spécifiquement par les spermatogonies souches. A l'heure actuelle, une association de plusieurs marqueurs s'avère indispensable pour un fractionnement immunologique satisfaisant. Le premier marqueur retenu était c-kit mais son expression s'est révélée non spécifique des spermatogonies souches, elle s'observe également dans les spermatogonies différenciées [26]. Plus récemment, les $\beta 1$ - et $\alpha 6$ -intégrines ont été retenues comme marqueurs de surface des spermatogonies souches [51]. La mise en culture d'une population purifiée de spermatogonies souches permet d'augmenter la longévité de ces cultures cellulaires accroissant ainsi le nombre de spermatogonies souches obtenu en fin de culture [15, 35, 62].

La culture *in vitro* des spermatogonies est un préalable indispensable avant leur transplantation dans un testicule receveur et l'injection d'une fraction enrichie en spermatogonies souches augmente l'efficacité de la colonisation des tubes séminifères [18].

2. La transplantation des cellules germinales

La première transplantation de cellules germinales a été effectuée avec succès en 1994 chez la souris par Brinster [7]. Les spermatogonies supposées "souches" ont été extraites d'un testicule d'un animal donneur et transplantées dans le testicule d'une souris mâle stérile. L'injection des spermatogonies s'est effectuée directement dans les tubes séminifères. Une importante dégénérescence des cellules transplantées a été observée, suggérant la nécessité d'enrichir la fraction injectée en spermatogonies souches et de modifier le protocole d'injection (site d'injection, volume injecté). L'injection de la suspension cellulaire dans les cônes efférents mais surtout le rete testis améliore la colonisation des tubes séminifères [46]. La transplantation de cellules germinales de rat dans les testicules de souris stériles aboutit à une spermatogenèse complète [12].

D'autres modèles de xénotransplantation, utilisant la souris comme animal receveur, se sont développés avec une initiation de la spermatogenèse extrêmement variable selon les modèles et le plus souvent avec une spermatogenèse quantitativement diminuée [40, 36, 21, 37]. Des greffes allogéniques ont donné également des résultats satisfaisants chez le rat, le bœuf, le singe et l'homme *in vitro* [46] mais aussi chez la souris [25]. Dans ce dernier modèle, les cellules souches germinales ont été initialement congelées puis transplantées après décongélation dans les testicules de souris mâles stériles non pubères et adultes. Une initiation de la spermatogenèse a été obtenue à la fois dans le groupe de souris adultes et de souris non pubères. Une fertilité spontanée a été obtenue uniquement dans le groupe de souris non pubères. L'efficacité de la transplantation semble inférieure dans le groupe receveur "souris adultes".

3. La greffe de tissu testiculaire

En se référant à la cryoconservation du tissu ovarien et l'utilisation des fragments congelés pour la réalisation de greffe orthotopiques ou hétérotopiques, Shinohara et coll. [52] congèlent des fragments de tissu testiculaire immature provenant de souris et de lapin. Après décongélation, le fragment testiculaire contenant en moyenne 23 tubes séminifères est greffé après ouverture de la tunique vaginale au milieu des tubes séminifères de la souris mâle adulte préalablement traitée par busulfan. A la fois dans la greffe allogénique et xénogénique, une spermatogenèse a été restaurée, des embryons ont été obtenus après fécondation *in vitro* dans les deux modèles, le nombre de grossesses et de naissances étant supérieur dans le deuxième modèle [lapin (donneur) - souris (receveur)].

4. Avantages et risques de ces différentes méthodologies

La mise en œuvre de ces différentes méthodologies soulèvent des interrogations sur les risques auxquels les patients peuvent être exposés et sur le bénéfice que ceux-ci peuvent en espérer :

- Le recours au prélèvement chirurgical pour isoler des cellules germinales ou du tissu testiculaire expose le patient aux complications immédiates et à court terme du geste chirurgical (risques opératoires, hématomes, complications infectieuses...).
- La maturation *in vitro* soulève des interrogations sur la qualité des gamètes matures produits avec possiblement des modifications génétiques et/ou épigénétiques de ces cellules du fait de la culture prolongée *in vitro*. Elle écarte cependant tout risque de réintroduction de l'affection cancéreuse et les gamètes produits seront utilisables en ICSI.
- Dans les modèles de greffes allogéniques (cellules germinales ou tissus), deux complications spécifiques peuvent être redoutées : les complications chirurgicales liées au geste de greffe, et le risque de réintroduire la pathologie tumorale surtout pour certaines pathologies comme les leucémies aiguës lymphoblastiques pour lesquelles

une localisation gonadique n'est pas écartée. Dans un modèle de greffe allogénique de cellules germinales provenant d'un rat leucémique, Jahnukainen et coll. [24] introduisent dans la fraction de cellules souches germinales destinée à la transplantation 20 cellules leucémiques provenant de rats leucémiques en phase terminale. Trois rats greffés sur cinq développent 21 jours après la transplantation une leucémie aiguë en phase terminale. Cette observation renforce le principe d'identification de marqueurs spécifiques des cellules souches germinales pour obtenir une fraction enrichie mais aussi pour réduire au maximum le risque de contamination de la suspension cellulaire par de cellules malignes. L'avantage de la greffe allogénique est le rétablissement possible d'une spermatogenèse associée à une fertilité spontanée, spécifiquement dans la transplantation des cellules germinales souches.

- La greffe xénogénique a pour avantage d'éviter tout risque de réintroduction de la pathologie cancéreuse chez le patient et de pouvoir envisager l'obtention de gamètes utilisables en ICSI. De plus, la transplantation des cellules germinales ou la greffe tissulaire peuvent échouer. La répétition du geste est envisageable chez l'animal mais est limitée chez l'homme. Cependant, la xéno greffe soulève certaines interrogations que sont : i) la contamination des gamètes produits par des agents infectieux d'origine animale, ii) des modifications génétiques et/ou épigénétiques liées à une régulation de la spermatogenèse qui présente certaines différences entre les espèces, iii) la faisabilité d'une telle approche sur le plan éthique.

IV. CONCLUSION

La conservation de spermatozoïdes éjaculés ou testiculaires doit être recommandée et plus largement répandue chez les adolescents avant tout traitement susceptible de retentir sur la fertilité. Chez le jeune garçon non pubère, comme cela est proposé chez la petite fille, la conservation du tissu gonadique doit être développée.

Cependant, il reste à définir, chez l'homme, les protocoles de congélation et décongélation du tissu testiculaire et les modalités d'utilisation ultérieure. Même si les publications concernant la transplantation des cellules germinales et la congélation du tissu testiculaire immature se multiplient, celles-ci intéressent majoritairement des modèles animaux avec des protocoles de congélation-décongélation variant au gré des publications.

Tout doit être mis en œuvre pour valider un protocole de congélation dans un modèle animal transférable secondairement dans un modèle humain, l'innocuité des procédures devra également être vérifiée. En effet, une inégalité de chance de préservation de la fertilité existe, à l'heure actuelle, entre le garçon et la petite fille soumis à des thérapeutiques gonadotoxiques.

REFERENCES

1. BAHADUR G., CHATTERJEE R., RALPH D. : Testicular tissue cryopreservation in boys. Ethical and legal issues : case report. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 1416-1420.
2. BAHADUR G., LING K.L., HART R. et al. : Semen production in adolescent cancer patients. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 2654-2656.
3. BAHADUR G., LING K.L., HART R. et al. : Semen quality and cryopreservation in adolescent cancer patients. *Hum. Reprod.*, 2002, 17 : 3157-3161.
4. 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. (Clin. Res. Ed.)*, 1988, 296 : 1372-1376.
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 : 2622-2631.
6. BIRCH J.M., ALSTON R.D., KELSEY A.M. et al. : Classification and incidence of cancers in adolescents and young adults in England 1979-1997. *Br. J. Cancer*, 2002, 87 : 1267-1274.
7. BRINSTER R.L., ZIMMERMANN J.W. : Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1994, 91 : 11298-11302.
8. BROOK P.F., RADFORD J.A., SHALET S.M., JOYCE A.D., GOSDEN R.G. : Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil. Steril.*, 2001, 75 : 269-274.
9. 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.
10. CENTOLA G.M., KELLER J.W., HENZLER M., RUBIN P. : Effect of low-dose testicular irradiation on sperm count and fertility in patients with testicular seminoma. *J. Androl.*, 1994, 15 : 608-613.
11. CLIFTON D.K., BREMNER W.J. : The effect of testicular x-irradiation on spermatogenesis in man. A comparison with the mouse. *J. Androl.*, 1983, 4 : 387-392.
12. 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.
13. CREMADES N., BERNABEU R., BARROS A., SOUSA M. : *In vitro* maturation of round spermatids using co-culture on Vero cells. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 1287-1293.
14. DE ROOIJ D.G., GROOTEGOED J.A. : Spermatogonial stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998, 10 : 694-701.
15. FENG L.X., CHEN Y., DETTIN L. et al. : Generation and *in vitro* differentiation of a spermatogonial cell line. *Science*, 2002, 297 : 392-395.
16. FISHEL S., ASLAM I., TESARIK J. : Spermatid conception : a stage too early, or a time too soon ? *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 1371-1375.
17. 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.
18. GIULI G., TOMLJENOVIC A., LABRECQUE N. et al. : Murine spermatogonial stem cells : targeted transgene expression and purification in an active state. *EMBO Rep.*, 2002, 3 : 753-759.
19. GRUNDY R., GOSDEN R.G., HEWITT M. et al. : Fertility preservation for children treated for cancer (1) : scientific advances and research dilemmas. *Arch. Dis. Child.*, 2001, 84 : 355-359.
20. HOVATTA O., SILYE R., KRAUSZ T. et al. : Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propandiol-sucrose as cryoprotectants. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 1268-1272.
21. HOVATTA O. : Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients. *Hum. Reprod. Update*, 2001, 7 : 378-383.
22. 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.
23. 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.
24. JAHNUKAINEN K., HOU M., PETERSEN C. et al. : Intratesticular transplantation of testicular cells from leukemic rats causes transmission of leukemia. *Cancer. Res.* 2001, 61(2) : 706-710.
25. 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.
26. LACHAM-KAPLAN O. : In vivo and in vitro differentiation of male germ cells in the mouse. *Reproduction*, 2004, 128 : 147-152.
27. LITTLE M.D., SHALET S.M., BEARDWELL C.G., ROBINSON E.L., SUTTON M.L. : Radiation-induced hypopituitarism is dose-dependent. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 1989, 31 : 363-373.
28. MCLEAN D.J., RUSSELL L.D., GRISWOLD M.D. : Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin A-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation. *Biol. Reprod.*, 2002, 66 : 1374-1379.
29. MEACHEM S., VON SCHONFELDT V., SCHLATT S. : Spermatogonia : stem cells with a great perspective. *Reproduction*, 2001, 121 : 825-834.
30. MEISTRICH M.L., WILSON G., KANGASNIEMI M., HUHTANIEMI I. : Mechanism of protection of rat spermatogenesis by hormonal pretreatment: stimulation of spermatogonial differentiation after irradiation. *J. Androl.*, 2000, 21 : 464-469.
31. MEISTRICH M.L., SHETTY G. : Suppression of testosterone stimulates recovery of spermatogenesis after cancer treatment. *Int. J. Androl.*, 2003, 26 : 141-146.
32. MERTENS A.C., YASUI Y., NEGLIA J.P. et al. : Late mortality experience in five-year survivors of childhood and adolescent cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J. Clin. Oncol.*, 2001, 19 : 3163-3172.
33. MULLER J., SKAKKEBAEK N.E. : Quantification of germ cells and seminiferous tubules by stereological examination of testicles from 50 boys who suffered from sudden death. *Int. J. Androl.*, 1983, 6 : 143-156.
34. MULLER J., SONKSEN J., SOMMER P. et al. : Cryopreservation of semen from pubertal boys with cancer. *Med. Pediatr. Oncol.*, 2000, 34 : 191-194.
35. NAGANO M., AVARBOCK M.R., LEONIDA E.B., BRINSTER C.J., BRINSTER R.L. : Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell*, 1998, 30 : 389-397.
36. NAGANO M., MCCARREY J.R., BRINSTER R.L. : Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. *Biol. Reprod.*, 2001, 64 : 1409-1416.

37. NAGANO M., PATRIZIO P., BRINSTER R.L. : Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertil. Steril.*, 2002, 78 : 1225-1233.
38. NISTAL M., PANIAGUA R. : Occurrence of primary spermatocytes in the infant and child testis. *Andrologia*, 1984, 16 : 532-536.
39. OEFFINGER K.C., HUDSON M.M. : Long-term complications following childhood and adolescent cancer: foundations for providing risk-based health care for survivors. *CA Cancer J. Clin.*, 2004, 54 : 208-236.
40. OGAWA T., DOBRINSKI I., AVARBOCK M.R., BRINSTER R.L.: Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol. Reprod.*, 1999, 60 : 515-521.
41. PARKS J.E., LEE D.R., HUANG S., KAPROTH M.T. : Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology*, 2003, 59 : 73-86.
42. POSTOVSKY S., LIGHTMAN A., AMINPOUR D. et al. : Sperm cryopreservation in adolescents with newly diagnosed cancer. *Med. Pediatr. Oncol.*, 2003, 40 : 355-359.
43. REMONTET L., ESTEVE J., BOUVIER A.M. et al. : Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev. Épidémiol. Santé Publique*, 2003, 51 : 3-30.
44. RIVES N. : Comment identifier le spermatozoïde vivant ? *Andrologie*, 2002, 12 : 332-341.
45. 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.
46. SCHLATT S., ROSIEN G., WEINBAUER G.F. et al. : Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 144-150.
47. SCHLATT S. : Spermatogonial stem cell preservation and transplantation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2002, 187 : 107-111.
48. SCHLATT S. : Germ cell transplantation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2002, 186 : 163-167.
49. SCHMIEGELOW M.L., SOMMER P., CARLSEN E. et al. : Penile vibratory stimulation and electroejaculation before anti-cancer therapy in two pubertal boys. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 1998, 20 : 429-430.
50. SHALET S.M., TSATSOULIS A., WHITEHEAD E., READ G. : Vulnerability of the human Leydig cell to radiation damage is dependent upon age. *J. Endocrinol.*, 1989, 120 : 161-165.
51. SHINOHARA T., AVARBOCK M.R., BRINSTER R.L. : Beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1999, 96 : 5504-5509.
52. 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.
53. SOFIKIS N., MANTZAVINOS T., LOUSTRADIS D. et al. : Ooplasmic injections of secondary spermatocytes for non-obstructive azoospermia. *Lancet*, 1998, 351 : 1177-1178.
54. SOMMELET D., LACOUR B., CLAVEL J. : Epidémiologie des cancers de l'enfant. *Bull. Acad. Natl. Med.*, 2003, 187 : 711-737.
55. SPEISER B., RUBIN P., CASARETT G. : Aspermia following lower truncal irradiation in Hodgkin's disease. *Cancer*, 1973, 32: 692-698.
56. SPRADLING A., DRUMMOND-BARBOSA D., KAI T. : Stem cells find their niche. *Nature*, 2001, 414 : 98-104.
57. STAUB C., HUE D., NICOLLE J.C. et al. : The whole meiotic process can occur in vitro in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp. Cell. Res.*, 2000, 260 : 85-95.
58. TESARIK J. : Fertilization of oocytes by injecting spermatozoa, spermatids and spermatocytes. *Rev. Reprod.*, 1996, 1 : 149-152.
59. 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: 4467-4473.
60. TESARIK J., MENDOZA C., GRECO E. : *In vitro* maturation of immature human male germ cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2000, 166 : 45-50.
61. THOMSON A.B., CRITCHLEY H.O., WALLACE W.H. : Fertility and progeny. *Eur. J. Cancer*, 2002, 38 : 1634-1644.
62. VAN DER WEE K.S., JOHNSON E.W., DIRAMI G., DYM T.M., HOFMANN M.C. : Immunomagnetic isolation and long-term culture of mouse type A spermatogonia. *J. Androl.*, 2001, 22 : 696-704.

Communication au Colloque de la Fédération des CECOS, Lyon, 18 mars 2004.

Préserver la fertilité des patients soumis à des traitements anti-cancéreux : la cryopréservation des gamètes et du tissu gonadique.

Manuscrit reçu : août 2004 ; accepté septembre 2004.

ABSTRACT

Cryopreservation of testicular tissue in boys: how can the boy's fertility be preserved?

Nathalie RIVES, Bertrand MACÉ

Survival rates for almost all types of childhood cancer have improved over the last 30 years. Estimates suggest that, in 2010, 1 out of 715 adolescents and young adults will be a long-term survivor of childhood cancer. With current therapy, 70% of children are cured. The increased number of survivors has focused attention on the many long-term or late sequelae of treatment. Most of the effects cannot be detected at the end of therapy, but only become apparent with puberty, growth and the normal aging process. Among the various sequelae, gonadal dysfunction is observed and the degree of gonadal damage depends on the type and total doses of chemotherapy and/or radiotherapy. The male gonad is also more sensitive to cancer therapy than the female gonad.

Cryopreservation of ejaculated spermatozoa should be proposed for sexually mature boys. However, when ejaculated semen samples cannot be collected, or in the case of prepubertal boys who are not yet able to produce spermatozoa, another strategy must be used: testicular biopsy associated with cryopreservation of (i) testicular tissue, or (ii) isolated testicular spermatozoa or (iii) immature germ cells. The future use of immature testicular tissue will depend on the development of novel technologies in humans such as germ cell *in vitro* maturation, or autologous or xenogeneic germ cell transplantation.

Key words : *childhood cancer, cryopreservation, fertility, germ cells, in vitro maturation, transplantation*