



**HAL**  
open science

# Conservation du tissu testiculaire chez le garçon pré-pubère dans le champ du cancer : Impact de la congélation et du traitement reçu sur la qualité du tissu

Aurélie Rives

## ► To cite this version:

Aurélie Rives. Conservation du tissu testiculaire chez le garçon pré-pubère dans le champ du cancer : Impact de la congélation et du traitement reçu sur la qualité du tissu. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-01919674

**HAL Id: dumas-01919674**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01919674v1>**

Submitted on 12 Nov 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE DE ROUEN**  
**UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**

---

2018

**THESE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN**  
**MEDECINE**

Présentée et soutenue publiquement le 19 octobre 2018

Par

**Aurélie RIVES**

**Née le 9 juin 1990 à Louviers (27)**

**Conservation du tissu testiculaire chez le garçon  
pré-pubère dans le champ du cancer :  
Impact de la congélation et du traitement reçu sur la  
qualité du tissu**

Président du Jury

Madame le Professeur Pascale SCHNEIDER

Directeur de Thèse

Madame le Professeur Agnès LIARD - ZMUDA

Membres du Jury

Madame le Professeur Martine PESTEL - CARON

Madame le Docteur Valérie MITCHELL

Monsieur le Professeur Louis SIBERT



**ANNEE UNIVERSITAIRE 2017 - 2018**  
**U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN**

---

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**  
**Professeur Benoit VEBER**  
**Professeur Pascal JOLY**  
**Professeur Stéphane MARRET**

<b>I - MEDECINE</b>
---------------------

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mr Frédéric <b>ANSELME</b>	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle <b>APTER</b>	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle <b>AUQUIT AUCKBUR</b>	HCN	Chirurgie plastique
Mr Fabrice <b>BAUER</b>	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya <b>BEKRI</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal <b>BENHAMOU</b>	HCN	Médecine interne
Mr Jacques <b>BENICHOU</b>	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier <b>BOYER</b>	UFR	Immunologie
Mme Sophie <b>CANDON</b>	HCN	Immunologie
Mr François <b>CARON</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe <b>CHASSAGNE</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Médecine interne (gériatrie) – Détachement
Mr Vincent <b>COMPERE</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas <b>CORNU</b>	HCN	Urologie
Mr Antoine <b>CUVELIER</b>	HB	Pneumologie
Mr Pierre <b>CZERNICHOW</b> ( <i>surnombre</i> )	HCH	Epidémiologie, économie de la santé

Mr Jean-Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan <b>DARMONI</b>	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mr Stéphane <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric <b>DI FIORE</b>	CB	Cancérologie
Mr Fabien <b>DOGUET</b>	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean <b>DOUCET</b>	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard <b>DUBRAY</b>	CB	Radiothérapie
Mr Philippe <b>DUCROTTE</b>	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice <b>DUPARC</b>	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
Mr Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
Mr Pierre <b>FREGER</b>	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
Mr Dominique <b>GUERROT</b>	HCN	Néphrologie
Mr Olivier <b>GUILLIN</b>	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier <b>HANNEQUIN</b>	HCN	Neurologie
Mr Fabrice <b>JARDIN</b>	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra <b>LAMIA</b>	Havre	Pneumologie
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale

Mr Joël <b>LECHEVALLIER</b>	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry <b>LEQUERRE</b>	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
Mr Hervé <b>LEVESQUE</b>	HB	Médecine interne
Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand <b>MACE</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
Mr Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépto-gastro-entérologie
M. Benoit <b>MISSET</b>	HCN	Réanimation Médicale
Mr Jean-François <b>MUIR</b> ( <i>surnombre</i> )	HB	Pneumologie
Mr Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophthalmologie
Mr Philippe <b>MUSETTE</b>	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe <b>PEILLON</b>	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan <b>PREVOST</b>	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace <b>ROMAN</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépto-gastrologie

Mme Céline <b>SAVOYE-COLLET</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
Mr Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Thérapeutique
Mr Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
Mr Christian <b>THUILLEZ</b> ( <i>surnombre</i> )	HB	Pharmacologie
Mr Hervé <b>TILLY</b>	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles <b>TOURNEL</b>	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier <b>TROST</b>	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre <b>VANNIER</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre <b>VERA</b>	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric <b>VERIN</b>	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier <b>VITTECOQ</b>	HB	Rhumatologie
Mme Marie-Laure <b>WELTER</b>	HCN	Physiologie

### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
Mme Valérie <b>BRIDOUX HUYBRECHTS</b>	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Neurophysiologie
Mme Sophie <b>CLAEYSSENS</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
Mr Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
Mr Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie cellulaire

Mr Thomas **MOUREZ** HCN Virologie  
Mr Gaël **NICOLAS** HCN Génétique  
Mme Muriel **QUILLARD** HCN Biochimie et biologie moléculaire  
Mme Laëtitia **ROLLIN** HCN Médecine du Travail  
Mr Mathieu **SALAUN** HCN Pneumologie  
Mme Pascale **SAUGIER-VEBER** HCN Génétique  
Mme Anne-Claire **TOBENAS-DUJARDIN** HCN Anatomie  
Mr David **WALLON** HCN Neurologie

### **PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE**

Mr Thierry **WABLE** UFR Communication  
Mme Mélanie **AUVRAY-HAMEL** UFR Anglais

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS

Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie Thérapeutique
Mr Roland <b>CAPRON</b> (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean <b>COSTENTIN</b> (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre <b>GOULLE</b> (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mme Isabelle <b>LEROUX - NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b> (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi <b>VARIN</b> (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy <b>BELLIEN</b> (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mme Camille <b>CHARBONNIER (LE CLEZIO)</b>	Statistiques
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
Mr Eric <b>DITTMAR</b>	Biophysique

Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
Mme Dominique <b>DUTERTE- BOUCHER</b>	Pharmacologie
Mr Abdelhakim <b>ELOMRI</b>	Pharmacognosie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique
Mr Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL <b>GHARBI-HAMZA</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique
Mr Hervé <b>HUE</b>	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia <b>LE GOFF</b>	Parasitologie – Immunologie
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie
M. Jérémie <b>MARTINET</b> (MCU-PH)	Immunologie
Mme Marine <b>MALLETER</b>	Toxicologie
Mme Sabine <b>MENAGER</b>	Chimie organique
Mme Tiphaine <b>ROGEZ-FLORENT</b>	Chimie analytique
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

### PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile <b>GUERARD-DETUNCQ</b>	Pharmacie officinale
Mr Jean-François <b>HOUIVET</b>	Pharmacie officinale

### PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde <b>GUERIN</b>	Anglais
----------------------------	---------

## ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Anne-Sophie **CHAMPY**

Pharmacognosie

M. Jonathan **HEDOUIN**

Chimie Organique

Mme Barbara **LAMY-PELLETER**

Pharmacie Galénique



## **LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES**

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie thérapeutique
Mr Roland <b>CAPRON</b>	Biophysique
Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Abdelhakim <b>ELOMRI</b>	Pharmacognosie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b>	Parasitologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie organique
Mme Isabelle <b>LEROUX-NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>	Microbiologie
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mr Rémi <b>VARIN</b>	Pharmacie clinique
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique



## ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

### PROFESSEURS

Mr Serguei <b>FETISSOV</b> (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul <b>MULDER</b> (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su <b>RUAN</b> (med)	Génie Informatique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil <b>ADRIOUCH</b> (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle <b>BOUGEARD-DENOYELLE</b> (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine <b>CLEREN</b> (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain <b>FRAINEAU</b> (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline <b>GAILDRAT</b> (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas <b>GUEROUT</b> (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel <b>LETELLIER</b> (med)	Physiologie
Mme Christine <b>RONDANINO</b> (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Antoine <b>OUVRARD-PASCAUD</b> (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric <b>PASQUET</b>	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle <b>TOURNIER</b> (med)	Biochimie (UMR 1079)

**CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS** : Mme Véronique **DELAFONTAINE**

**HCN - Hôpital Charles Nicolle**

**HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME**

**CB - Centre Henri Becquerel**

**CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray**

**CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation** **SJ – Saint Julien Rouen**

*Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.*

Au président de jury,

**A Madame le Professeur Pascale SCHNEIDER**

Merci de me faire l'honneur d'accepter de présider mon jury et de juger ce travail.

Merci pour votre collaboration lors de ce projet.

Je vous exprime ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

**A Madame le Professeur Martine PESTEL – CARON**

Merci de me faire l'honneur d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de juger ce travail.

Merci de m'avoir fait apprécier la Bactériologie lors de mon semestre dans votre service,  
spécialité qui m'effrayait initialement et dont j'ai appris énormément de choses.

Je vous exprime ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

**A Madame le Docteur Valérie MITCHELL**

Merci de me faire l'honneur d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de juger ce travail.

Merci pour l'aide diagnostique que vous nous apportez en réalisant la microscopie électronique chez nos patients présentant des dyskinésies flagellaires, ainsi que pour votre participation *via* l'inclusion de patients de ce projet.

Je vous exprime ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

**A Monsieur le Professeur Louis SIBERT**

Merci de me faire l'honneur d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de juger ce travail.

Merci pour votre collaboration lors de ce projet.

Je vous exprime ma sincère reconnaissance et mon profond respect.



**A Madame le Professeur Agnès ZMUDA - LIARD**

Merci de me faire l'honneur d'accepter de diriger ce travail.

Merci pour votre implication et de celle de tous les chirurgiens pédiatriques ayant participé à ce projet, nous permettant d'offrir un potentiel avenir après le cancer pour ces garçons.

Je vous exprime ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

Merci,

A mes collègues de l'EA4308, Christine, pour ton encadrement durant mon année recherche. Ludovic, pour ton côté ronchon maniaque et tes goûts musicaux... spéciaux. Antoine, pour tes petits coups de gueule et tes moments mutes. Justine, pour m'avoir dépassé en débit de parole, Marion, pour avoir été capable de tous nous supporter, vive le body attack ! Un grand merci à tous pour m'avoir initiée à la recherche dans le monde des souris.

A mes collègues du laboratoire de Biologie de la reproduction : France, pour ton enseignement, tes conseils et ta gentillesse ; Fanny, pour ton écoute infaillible, ton amour de l'embryoscope que tu m'as fait partager et parce qu'avec toi le nord est dignement représenté ; Pierre et Benoit, pour les midis avions de chasse ; Sophie, Lydie, Elodie, Julie, pour le temps passé à me former et pour les bons moments en pause-café ; A Amandine, pour ton implication dans ce projet, et pour ta gentillesse ; Véronique, pour ton aide et soutien durant mon année recherche, Melinda, Charlotte et Aurélie, pour votre bonne humeur et vos rires.

Aux différents CECOS de Lille, Nantes, Besançon, Lyons, Caen, Clermont-Ferrand et Toulouse, pour leur participation dans le PHRC PROSPERMA.

A Mickael Bubenheim, pour la réalisation d'une partie des analyses statistiques.

Mais aussi

Un grand merci à Jean-Pierre Milazzo, qui a permis la naissance de ce projet et qui a tant fait pour le développement de notre équipe de recherche, tu nous manques à tous.

Merci,

A mes amis de la fac, Guillaume, Jonathan, Nicolas, Sofiene, Bastien, Clément et tant d'autres, pour nos bons moments passés ensemble et pour l'amitié que nous partageons.

A Guillaume, mangeur de princes, pour être toujours disponible pour un verre et pour n'avoir jamais pu manger avec toi à la pizzeria du drugstore ^^.

A Aude, pour tous nos bons moments partagés depuis la P1, et pour m'avoir généreusement hébergée durant nos nuits de soirée ^^.. A Thibaut, pour nos moments café et nos moments crises existentielles.

A Pauline, pour notre amitié retrouvée. Je ne te remercierai jamais assez de l'aide que tu m'as apportée durant la P1.

A Maité, pour ton grain de folie, ta joie de vivre mais surtout pour ton franc parlé ! A Julien, pour supporter cette folie ^^, pour ta source inépuisable de vidéos (merci peepodo...) mais surtout pour nos bons moments à LH, Hachtage plus belle ville du Monde !

A Charlotte, Geoffrey, Valérie et Benjamin, pour ces belles soirées passées chez vous mais aussi pour votre grand cœur et votre générosité.

A Aurélie, pour avoir été ma plus belle rencontre durant cet internat. Cette complicité instantanée durant notre stage de biochimie m'a permis de découvrir une personne exceptionnelle à qui je pouvais tout confier sans jugement. Merci « m'amour » pour ta gentillesse, ton écoute et ton soutien.

A mes co-internes et amis, Charline, pour nos points communs shopping et ta gentillesse ; Bénédicte, pour ton franc parlé, ton rire et nos moments gossip ; Kévin, pour tes kévinades et tes coups de gueule mais aussi pour ta Star Wars mania, Cynthia, pour les bons moments passés avec toi.

Merci,

A mes parents, pour tout l'amour et le soutien dont ils ont fait preuve durant toutes les étapes importantes de ma vie, pour m'avoir inculqué la rigueur du travail, bien qu'enfant je n'ai pas toujours compris dans quel but, une fois adulte il ne fait pas de doute que tout ceci m'a permis d'arriver jusqu'ici.

A ma mère, plus particulièrement, pour m'avoir transmis le virus de la Biologie de la Reproduction depuis petite en t'accompagnant à tes samedis d'astreinte au laboratoire. Par le simple fait que tu es pour moi, un modèle sur tous les plans (à se demander s'il n'y a pas un peu de magie derrière tout cela).

A mes sœurs et mon petit frère. Emeline, pour tous nos bons moments et nos crêpages de chignons et Dieu sait qu'il y en a eu ! (hein dit Emeuh !). Coralie, pour ton côté pacifiste et ta gentillesse, pas facile pour toi Coco avec deux sœurs comme nous ! Mathieu, pour être le pacha chouchouté par 3 sœurs, pour tes pas de danse de Oumtich.

A tout le bestiaire de la famille Rives ! Snow, Leeloo, Gusto, Ola, Loulou et tous ceux d'avant !

A mes grands-parents, Pépé Gilles et Mémé Lucie partis trop tôt ; Pépé Joseph et Mémé Nicolle, pour votre amour.

A mes futurs beaux-parents, Brice et Christine, pour m'avoir accueillie dans votre famille, pour votre soutien et votre gentillesse malgré le fait que je vous vole votre fils !

A Lyra, notre petit chat d'amour, pour avoir passé beaucoup de temps à me soutenir durant cette rédaction, bien que te mettre sur le clavier en ronronnant ne soit pas la meilleure des idées !

Et surtout

A mon futur mari, Anthony, pour être mon meilleur ami, mon confident, tout pour mes yeux. Grâce à toi, ces années d'étude ont été plus douces. Merci pour ton soutien et ton amour. Une page se tourne, et quel plaisir d'écrire les suivantes avec toi.

# Table des matières

---

<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>3</b>
CANCERS DE L'ENFANT .....	4
TRAITEMENT DES CANCERS DE L'ENFANT .....	7
PRESERVATION DE LA FERTILITE CHEZ LE GARÇON .....	10
INDICATION DE LA CONSERVATION DU TISSU TESTICULAIRE .....	12
PROTOCOLE DE CONGELATION DU TISSU TESTICULAIRE.....	14
ÉVALUATION DE LA QUALITE DU TISSU TESTICULAIRE .....	20
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>21</b>
CONTEXTE DE L'ÉTUDE .....	21
PRELEVEMENT CHIRURGICAL TESTICULAIRE .....	22
TRAITEMENT ET CONGELATION DU TISSU TESTICULAIRE .....	22
ANALYSES HISTOLOGIQUES .....	24
<i>Préparation des coupes histologiques.....</i>	<i>24</i>
<i>Coloration à l'HES (Hémalun-Éosine-Safran) .....</i>	<i>24</i>
<i>Marquages immuno-histochimiques .....</i>	<i>26</i>
QUANTIFICATION DES CELLULES GERMINALES.....	28
MORPHOMETRIE .....	29
ÉVALUATION SEMI-QUANTITATIVE DES ALTERATIONS MORPHOLOGIQUES.....	29
TRAITEMENTS GONADOTOXIQUES .....	30
<i>Dose cumulée d'agent de chimiothérapie.....</i>	<i>30</i>
<i>« Cyclophosphamide equivalent dose » (CED) .....</i>	<i>31</i>
<i>Dose cumulée d'Anthracyclines.....</i>	<i>32</i>
<i>Radiothérapie.....</i>	<i>32</i>
ANALYSES STATISTIQUES .....	33

<b>RESULTATS.....</b>	<b>34</b>
DESCRIPTION DE LA POPULATION ETUDIEE .....	34
LES TRAITEMENTS REÇUS .....	39
ÉVALUATION HISTOLOGIQUE DU TISSU TESTICULAIRE .....	42
<i>Effet de la congélation sur le tissu testiculaire.....</i>	<i>42</i>
<i>Effet de la pathologie tumorale sur le tissu testiculaire.....</i>	<i>44</i>
<i>Effet de l'âge sur le tissu testiculaire.....</i>	<i>44</i>
<i>Effet des agents alkylants sur le tissu testiculaire.....</i>	<i>46</i>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>49</b>
IMPACT DE LA CONGELATION SUR LE TISSU TESTICULAIRE.....	49
IMPACT DES TRAITEMENTS SUR LE TISSU TESTICULAIRE.....	50
IMPACT DU TYPE DE PATHOLOGIE Tumorale SUR LE TISSU TESTICULAIRE .....	52
IMPACT DE L'ÂGE SUR LE TISSU TESTICULAIRE .....	54
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>55</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>56</b>

# Abréviations

---

<b>AAD</b>	Alkylating agent dose score
<b>CECOS</b>	Centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme humain
<b>CSS</b>	Cellules souches spermatogoniales
<b>CCR</b>	Cohorte du CHU de Rouen Normandie
<b>DCA</b>	Dose cumulée d'anthracycline
<b>DCI</b>	Dénomination commune internationale
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>EG</b>	Ethylène glycol
<b>GCSH</b>	Greffe de cellules souches hématopoïétiques
<b>Gy</b>	Gray
<b>HES</b>	Hemalun, Eosine, Safran
<b>HBSS</b>	Hank's balanced salt solution
<b>HSA</b>	Human serum albumine
<b>ICSI</b>	Intracytoplasmic sperm injection
<b>LA</b>	Leucémie aigüe
<b>LAM</b>	Leucémie aiguë myéloïde
<b>LAL</b>	Leucémie aiguë lymphoïde
<b>L</b>	Lymphome
<b>LH</b>	Lymphome hodgkinien
<b>LNH</b>	Lymphome non hodgkinien
<b>MAGE-A4</b>	Melanoma associated antigen 4

<b>N</b>	Neuroblastome
<b>PCNA</b>	Proliferating cell nuclear antigen
<b>PHRC</b>	Protocole hospitalier de recherche clinique
<b>PNET</b>	Primitive neuroectodermal tumour
<b>S</b>	Sarcome
<b>TC</b>	Tumeur cérébrale
<b>TESE</b>	Testicular sperm extraction
<b>TUNEL</b>	Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling
<b>SC</b>	Surface corporelle (m <sup>2</sup> )



# Introduction

---

Environ 2550 nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués annuellement chez les enfants et les adolescents, avec une incidence nettement plus forte chez les enfants de moins de 15 ans (1750 nouveaux cas par an). Bien que rares, ces cancers constituent la deuxième cause de mortalité entre 1 et 14 ans et la troisième cause entre 15 et 19 ans (Institut National du Cancer, 2016). Même si le taux de survie s'améliore de façon significative, les complications ou les séquelles liées au traitement de la maladie sont fréquentes chez les patients guéris d'un cancer de l'enfance, l'infertilité à l'âge adulte constituant l'une d'entre elles. La toxicité des traitements du cancer sur la gonade a longtemps été laissée pour compte, la priorité étant l'urgence du diagnostic et de l'introduction d'une thérapie efficace pour l'enfant. A l'heure actuelle, l'amélioration des taux de survie associée au développement de procédures de congélation des gamètes et tissus germinaux rend difficile de ne pas proposer à ces enfants ou adolescents une préservation de leur fertilité (Picton *et al.*, 2015).

Chez la petite fille, des stratégies de préservation de la fertilité ont été développées depuis quelques années, la congélation du tissu ovarien pouvant être intégrée dans le parcours de soin. L'utilisation *via* la greffe orthotopique de fragments de tissu ovarien restaure non seulement la fonction endocrine mais a aussi permis la naissance de près d'une centaine d'enfants dans le monde (Dunlop *et al.*, 2016). Il en est de même chez le garçon pubère, où la congélation de spermatozoïdes est de pratique courante (Picton *et al.*, 2015).

En revanche, chez le garçon pré-pubère ou le garçon pubère dans l'incapacité de recueillir ses spermatozoïdes, peu de solutions sont encore proposées en pratique courante. Le prélèvement chirurgical de tissu testiculaire et sa congélation constitue une des procédures pour remédier à ce manque, mais elle reste expérimentale et peu de centres français la propose aux garçons pré-pubères.

## Cancers de l'enfant

Les cancers de l'enfant diffèrent de ceux de l'adulte de par leur localisation et leur pronostic. Chez les enfants de moins de 15 ans, les leucémies aigües (28,7%), les tumeurs du système nerveux central (23,3%) et les lymphomes (11,9%) sont les principales localisations (Lacour *et al.*, 2010) (**Tableau I**). Environ 45% des cancers de l'enfant surviennent avant l'âge de 5 ans (Le Guyader-Peyrou *et al.*, 2016) avec un sexe ratio en défaveur des garçons (Binder-Foucard *et al.*, 2014). Chez les adolescents de 15 à 19 ans, les données épidémiologiques françaises diffèrent de celles rapportées aux États-Unis. En France, les types les plus fréquents sont le lymphome hodgkinien (LH) (21,6%), les leucémies (13,7%) et les tumeurs germinales (11,2%) (Desandes *et al.*, 2016) (**Tableau I**). Aux États-Unis, le LH reste la première cause pour cette tranche d'âge (21%), suivi par les tumeurs du système nerveux central (17%) et les leucémies (14%) (Siegel *et al.*, 2017).

Le taux de survie des enfants et adolescents atteints d'un cancer s'est amélioré de manière significative, avec près de 82% à 5 ans, tous types de cancer et tous âges confondus (Bossard *et al.*, 2007; Desandes *et al.*, 2016). Aux États-Unis, le taux de survie à 5 ans, pour le groupe des 15 à 19 ans, est égal voire supérieur à celui du groupe des moins de 15 ans, respectivement 83,9% et 83% (Smith *et al.*, 2014). La même tendance est observée en France, et ce grâce à l'harmonisation de la prise en charge dans cette tranche d'âge permettant un meilleur taux de survie, initialement inférieur au groupe des moins de 15 ans pour les leucémies, les lymphomes non hodgkiniens (LNH) et les sarcomes (Desandes *et al.*, 2007). Le taux de survie à 5 ans dépend principalement du type de cancer (**Tableau II**). Aux États-Unis, ce taux varie de 97,7 % pour le LH chez les enfants de moins de 15 ans à 48,9% pour les rhabdomyosarcomes chez les adolescents entre 15 et 19 ans (Siegel *et al.*, 2017). En France, ce taux de survie est de 37,5% pour les rhabdomyosarcomes de l'adolescent (Desandes *et al.*, 2016). Avec l'amélioration des thérapeutiques sur ces 30 dernières années, on pouvait estimer qu'en 2010, un adulte sur 530, âgé entre 20 et 39 ans, était un adulte guéri d'un cancer de l'enfance ou l'adolescence (Ward *et al.*, 2014).

Type de cancer	Moins de 15 ans	15 à 19 ans
<i>Leucémies</i>	28,7%	13,7%
<i>Lymphomes</i>	11,9%	26,8% (21,6% LH, 6,2% LNH)
<i>Tumeurs du système nerveux central</i>	23,3%	7,7%
<i>Neuroblastomes</i>	8,4%	0,6%
<i>Tumeurs malignes osseuses</i>	4,8%	8,3%
<i>Sarcomes des tissus mous</i>	6,2%	6,3%
<i>Tumeurs germinales et gonadiques</i>	3,9%	11,2%
<i>Tumeurs épithéliales et mélanomes malins</i>	3,1%	21,4%

**Tableau I** : Répartition des principaux cancers de l'enfant en fonction de leur tranche d'âge (Desandes *et al.*, 2016)

**LH** : Lymphome hodgkinien ; **LNH** : Lymphome non hodgkinien

Type de cancer	Moins de 15 ans		15 à 19 ans	
	Survie globale à 1 an % (IC 95%)	Survie globale à 5 ans % (IC 95%)	Survie globale à 1 an % (IC 95%)	Survie globale à 5 ans % (IC 95%)
<i>Leucémies</i>	<b>93,7</b> (92,9-94,4)	<b>84,5</b> (83,4-85,6)	<b>88,9</b> (82,4-93,0)	<b>67,3</b> (58,9-74,4)
<i>Lymphomes hodgkiniens</i>	<b>99,3</b> (98,4-99,7)	<b>96,3</b> (94,6-97,5)	<b>99,6</b> (97,1-99,9)	<b>96,9</b> (93,6-98,5)
<i>Lymphomes non hodgkiniens</i>	<b>93,3</b> (90,8-95,1)	<b>88,3</b> (85,1-90,8)	<b>91,7</b> (82,5-96,2)	<b>78,9</b> (67,4-86,7)
<i>Tumeurs du système nerveux central</i>	<b>84,3</b> (83,1-85,4)	<b>71,9</b> (70,4-73,4)	<b>87,9</b> (79,7-92,9)	<b>67,3</b> (57,1-75,7)
<i>Neuroblastomes</i>	<b>91,0</b> (89,3-92,5)	<b>74,1</b> (71,6-76,5)	-	-
<i>Tumeurs malignes osseuses</i>	<b>94,6</b> (92,7-96,0)	<b>74,4</b> (71,0-77,5)	<b>92,1</b> (82,0-96,6)	<b>50,0</b> (37,0-61,7)
<i>Sarcomes des tissus mous</i>	<b>90,6</b> (88,5-92,2)	<b>70,6</b> (67,6-73,4)	<b>94,5</b> (86,1-97,9)	<b>69,7</b> (57,4-79,1)
<i>Tumeurs germinales et gonadiques</i>	<b>95,3</b> (93,3-96,7)	<b>92,2</b> (89,7-94,1)	<b>97,0</b> (93,4-98,6)	<b>88,7</b> (83,2-92,5)
<i>Tumeurs épithéliales et mélanomes malins</i>	<b>96,0</b> (93,6-97,5)	<b>92,6</b> (89,9-94,6)	<b>96,5</b> (93,8-98,1)	<b>90,6</b> (86,7-93,4)
Total	<b>91,7</b> (91,3-92,2)	<b>81,6</b> (81,0-82,2)	<b>94,5</b> (93,1-95,6)	<b>81,8</b> (79,5-83,9)

**Tableau II** : Taux de survie en fonction du type de cancer à 1 an et 5 ans en fonction de la tranche d'âge (Lacour *et al.*, 2014 ; Desandes *et al.*, 2016)

## Traitement des cancers de l'enfant

Le cancer de l'enfant se traite de façon similaire à celui de l'adulte. Les traitements comportent de la chimiothérapie ou de la radiothérapie d'une part, une association des deux en complément de la chirurgie si nécessaire d'autre part. L'augmentation de l'efficacité des traitements s'associe à une augmentation de leur toxicité. Ils affectent chaque organe ou tissu, avec des atteintes variables selon les molécules et leur mécanisme d'action, leur dose cumulée et leur intensité. De plus, en fonction de la réponse aux traitements ou du type de tumeur et de son stade, une allogreffe ou une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques peut être nécessaire dans la prise en charge thérapeutique de l'enfant. Le traitement de conditionnement avant ces greffes engage le pronostic fonctionnel de la gonade, soit par chimiothérapie ablative, soit par irradiation corporelle totale (**Tableau III**).

La plupart des cancers de l'enfant et de l'adolescent sont traités par une combinaison de chimiothérapies. La chimiothérapie peut être néo-adjuvante ou adjuvante en soutien de la chirurgie pour les tumeurs solides. Celle-ci comprend souvent une association de molécules, dont la dose est adaptée au poids et à l'âge de l'enfant. Nous savons depuis de nombreuses années que l'administration à haute dose d'agents alkylants, de vinblastine et d'anti-métabolites peuvent provoquer des dommages irréversibles sur le testicule (Müller, 2003). De plus, il est prouvé que le tissu testiculaire et plus précisément les cellules germinales souches sont plus sensibles aux chimiothérapies que les cellules de Leydig (Müller, 2003).

La radiothérapie peut toucher le testicule de façon directe par irradiation du testicule lui-même ou à proximité du testicule mais aussi de façon indirecte lors d'une irradiation cérébrale. Une radiothérapie pelvienne ou testiculaire atteint le testicule autant sur le plan exocrine qu'endocrine en fonction de la dose reçue, de la dose cumulée et de son fractionnement. Une dose comprise entre 0,1 et 1,2 Gray (Gy) induit une atteinte de l'épithélium séminifère entraînant une destruction partielle du *pool* de spermatogonies ; en revanche, une dose unique supérieure à 4 Gy entraîne une stérilité définitive (Jahnukainen *et al.*, 2015). De même, les doses fractionnées ont un effet plus délétère, puisqu'elles augmentent par effet cumulé les dommages des cellules germinales qui n'ont pas le temps de réparer les dommages cellulaires entre deux séances. Une azoospermie permanente peut

être observée à partir d'une dose cumulée dépassant 1,2 Gy. (Howell & Shalet 2005). Au-delà de 20 Gy, les lésions des cellules de Leydig deviennent permanentes, responsables d'une insuffisance endocrine (Shalet *et al.*, 1989). Si l'irradiation cérébrale atteint des doses cumulées comprises entre 35 et 45 Gy, l'axe hypothalamo-hypophysaire est irrémédiablement altéré entraînant un défaut de production des gonadotrophines hypophysaires (Howell and Shalet, 2002 ; Merchant *et al.*, 2009). En revanche, pour des doses cumulées inférieures à 26 Gy, il n'a pas été démontré d'effet notable sur l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire (Green *et al.*, 2017). L'irradiation corporelle totale avant greffe de cellules souches hématopoïétiques engage irrémédiablement le pronostic reproductif de l'enfant puisque moins de 2% de ces enfants seront fertiles à l'âge adulte (Sanders *et al.*, 1996).

Bon Pronostic	Pronostic intermédiaire	Mauvais pronostic
Azathioprine	Thiotepa	Cyclophosphamide (>7,5 g/m <sup>2</sup> )
Fludarabine	Gemcitabine	Ifosfamide (>60 g/m <sup>2</sup> )
Methotrexate	Cisplatine	Mustine, carmustine
6-mercaptopurine	Oxaliplatine	Busulfan
Vincristine	Carboplatine	Chlorambucil (>1,4 g/m <sup>2</sup> )
Vinblastine	Doxorubicine	Melphalan (140 mg/m <sup>2</sup> )
Bléomycine	Dacarbazine	Chlorméthine
Dactinomycine	Cytarabine	Procarbazine (>4 g/m <sup>2</sup> )
Etoposide	Daunorubicine	Cisplatine (>600 mg/m <sup>2</sup> )
	Mitoxantrone	Mechloréthamine
		Irradiation corporelle totale
		Radiothérapie localisée (pelvis, testicule)
		Chimiothérapie de conditionnement

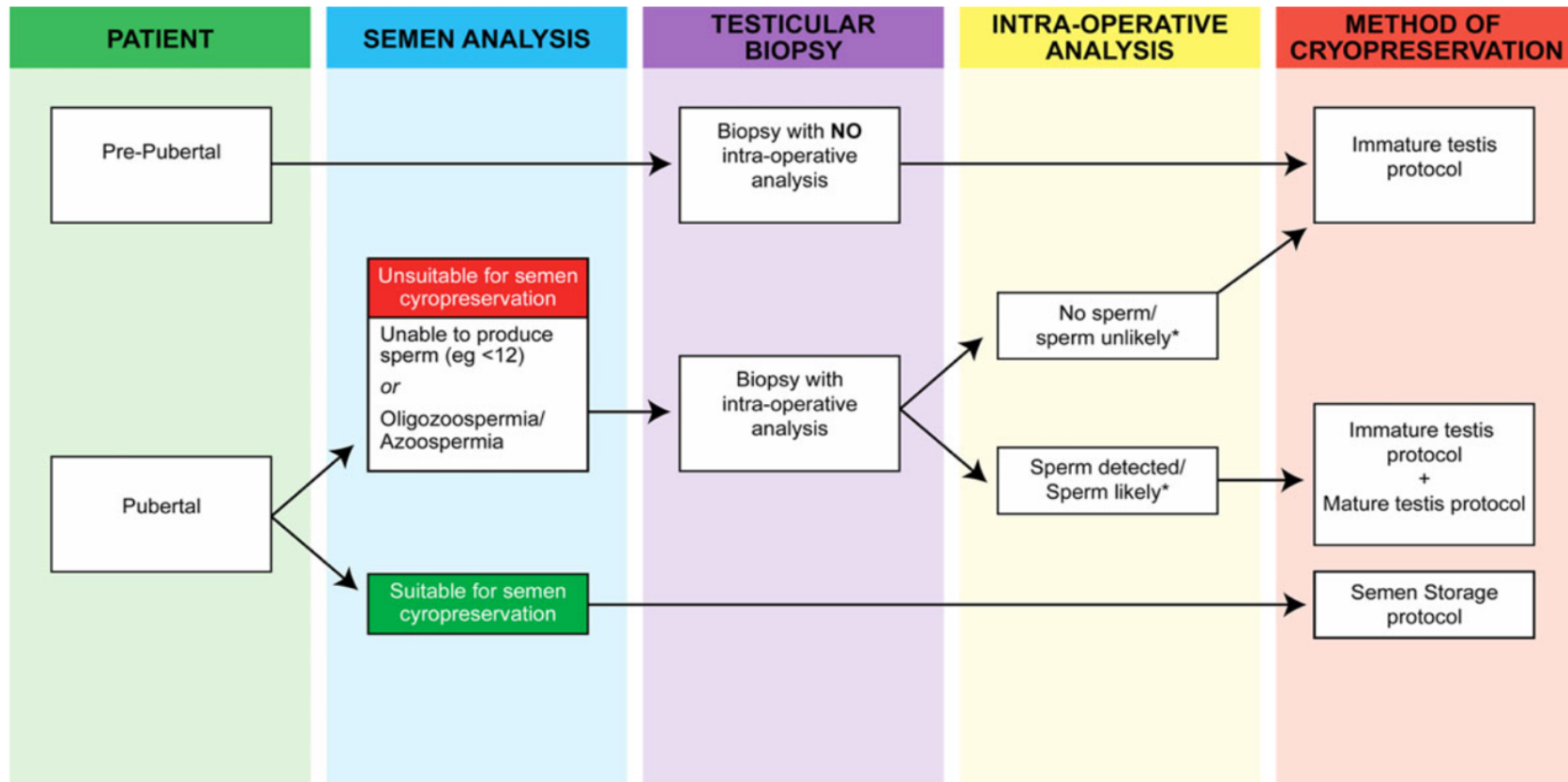
**Tableau III :** Pronostic sur la fertilité à long terme en fonction des différents agents de chimiothérapie, radiothérapie et conditionnement pré-greffe (Wyns *et al.*, 2010)

## Préservation de la fertilité chez le garçon

L'initiation de la spermatogenèse intervient entre 10 et 12 ans, et le testicule peut produire des spermatozoïdes qualitativement et quantitativement normaux vers l'âge de 13-14 ans (Nistal and Paniagua, 1984).

Ainsi, les solutions proposées pour préserver la fertilité masculine diffèrent en fonction de l'âge du patient. Chez le garçon pubère, il est théoriquement possible d'effectuer une congélation de spermatozoïdes, si le garçon est au stade III de Tanner et a un volume testiculaire supérieur à 5 mL (Picton *et al.*, 2015). Néanmoins, durant la période péri-pubertaire, une immaturité physiologique du testicule est souvent présente avec un risque important d'oligozoospermie sévère voire d'azoospermie (Daudin *et al.*, 2015). Une procédure alternative consiste à envisager la biopsie testiculaire avec extraction de spermatozoïdes (Onco-TESE) suivie de leur congélation. Cette Onco-TESE, si elle s'avère négative, peut être associée à la congélation d'une partie du tissu testiculaire, afin de pouvoir conserver des cellules souches spermatogoniales (CSS) si elles sont présentes. Chez le garçon pré-pubère, ne produisant pas de spermatozoïdes, l'Onco-TESE n'a pas d'intérêt mais la congélation du tissu testiculaire immature semble être une solution acceptable, avec pour objectif, une préservation des CSS (Wyns *et al.*, 2011). Il est bien entendu important d'informer les patients que leur possible utilisation ultérieure reste à l'heure actuelle du domaine de la recherche. En 2015, une concertation pluridisciplinaire de spécialistes européens a proposé un algorithme de prise en charge de la préservation de la fertilité des garçons ou adolescents, avant traitement gonadotoxique, dans ou en dehors du champ du cancer (**Figure 1**) (Picton *et al.*, 2015).





**Figure 1 :** Algorithme de prise en charge de la préservation de la fertilité chez les garçons pré-pubères et adolescents (Picton *et al.*, 2015)

## Indication de la conservation du tissu testiculaire

En France, la conservation du tissu testiculaire est inscrite dans la loi relative à la bioéthique du 7 juillet 2011, qui précise dans le Code de la Santé publique : « Art. L. 2141-11 - Toute personne dont la prise en charge médicale est susceptible d'altérer la fertilité, ou dont la fertilité risque d'être prématurément altérée, peut bénéficier du recueil et de la conservation de ses gamètes ou de ses tissus germinaux, en vue de la réalisation ultérieure, à son bénéfice, d'une assistance médicale à la procréation, ou en vue de la préservation et de la restauration de sa fertilité ».

La conservation du tissu testiculaire est ainsi proposée chez le garçon pré-pubère voire l'adolescent dans le cadre de traitements à haut risque sur le pronostic de la fertilité ultérieure : les chimiothérapies à mauvais pronostic sur la fertilité, l'irradiation corporelle totale ou pelvienne, le conditionnement avant greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans ou en dehors du champ du cancer (**Tableau III** ; Picton *et al.*, 2015).

Les données de la littérature (**Tableau IV**) mettent en évidence que certaines équipes internationales n'excluent pas la possibilité de proposer la conservation du tissu testiculaire pour les traitements à risque faible ou modéré sur la fertilité future (Keros *et al.*, 2007 ; Wyns *et al.*, 2007, 2008 ; Ginsberg *et al.*, 2010 ; Curaba *et al.*, 2011 ; Wyns *et al.*, 2011 ; Babayev *et al.*, 2013 ; Goossens *et al.*, 2013 ; Poels *et al.*, 2013 ; Sadri-Ardekani *et al.*, 2016 ; De Michele *et al.*, 2017 ; Ho *et al.*, 2017). Dans et hors champ du cancer, la congélation du tissu testiculaire est aussi envisagée lors d'une orchidectomie bilatérale ou unilatérale sur testicule unique (Picton *et al.*, 2015). Deux autres indications plus exceptionnelles de conservation du tissu testiculaire sont représentées par les garçons pré-pubères ou adolescents présentant un syndrome de Klinefelter (Wyns *et al.*, 2011 ; Goossens *et al.*, 2013 ; Rives *et al.*, 2013) ou les garçons pré-pubères avec une cryptorchidie, cette conservation étant pratiquée lors de l'orchidopexie du testicule de façon unilatérale ou bilatérale (Kvist *et al.*, 2006 ; Wyns *et al.*, 2007).

L'utilisation du tissu testiculaire décongelé actuellement à l'étude pourrait être envisagée pour produire des spermatozoïdes utilisables en Assistance Médicale à la Procréation : (i) la maturation *in vitro* des spermatogonies (spermatogenèse *in vitro*),

(ii) la maturation *in vivo* des spermatogonies après transplantation autologue ou greffe de tissu testiculaire, et éventuellement (iii) la maturation *in vivo* chez l'animal des spermatogonies après xéno-transplantation ou xénogreffe (Goossens *et al.*, 2013).

## Protocole de congélation du tissu testiculaire

A l'heure actuelle, il n'existe aucun protocole de référence concernant la congélation du tissu testiculaire humain. Les données de la littérature (**Tableau IV**) ne mentionnent que peu d'études intéressant la congélation du tissu testiculaire chez le garçon pré-pubère dans le champ du cancer avec des effectifs le plus souvent faibles (2 à 48 patients) et surtout pour l'indication principale proposée actuellement en France, à savoir avant allo- ou autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (2 à 36 patients) (Keros *et al.*, 2007 ; Wyns *et al.*, 2011 ; Poels *et al.*, 2013 ; Ginsberg *et al.*, 2014 ; Pietzak *et al.*, 2015). Le protocole de congélation le plus souvent utilisé est la congélation lente contrôlée avec *seeding* (Keros *et al.*, 2005, 2007 ; Wyns *et al.*, 2007, 2008 ; Ginsberg *et al.*, 2010 ; Curaba *et al.*, 2011 ; Wyns *et al.*, 2011 ; Babayev *et al.*, 2013 ; Poels *et al.*, 2013 ; Ginsberg *et al.*, 2014 ; Pietzak *et al.*, 2015 ; Ho *et al.*, 2017 ; de Michele *et al.*, 2017 ; Poganitsch-Korhonen *et al.*, 2017 ; Stukenborg *et al.*, 2018). Le Diméthylsulfoxyde (DMSO), cryoprotecteur pénétrant, ayant montré sa supériorité sur l'éthylène glycol (EG) (Keros *et al.*, 2005) semble être le plus recommandé dans les plus récents protocoles de congélation lente (Keros *et al.*, 2007 ; Wyns *et al.*, 2007, 2008 ; Ginsberg *et al.*, 2010 ; Curaba *et al.*, 2011 ; Wyns *et al.*, 2011 ; Babayev *et al.*, 2013 ; Poels *et al.*, 2013 ; Ginsberg *et al.*, 2014 ; Pietzak *et al.*, 2015 ; Ho *et al.*, 2017 ; De Michele *et al.*, 2017), l'EG n'étant rapporté que par une seule équipe (Kvist *et al.*, 2006). Il en est de même pour le glycérol et le propanediol (Bahadur *et al.*, 2000). Le sucrose, cryoprotecteur non pénétrant, est également ajouté comme composant des milieux de congélation (Bahadur *et al.*, 2000 ; Kvist *et al.*, 2006 ; Wyns *et al.*, 2007, 2008 ; Curaba *et al.*, 2011 ; Wyns *et al.*, 2011 ; Babayev *et al.*, 2013 ; Goossens *et al.*, 2013 ; Poels *et al.*, 2013 ; Ho *et al.*, 2017 ; De Michele *et al.*, 2017). De manière plus exceptionnelle, sont rapportés des protocoles de congélation (i) lente contrôlée sans *seeding* (Sadri-Ardekani *et al.*, 2016), (ii) lente non contrôlée (Goossens *et al.*, 2013) et (iii) rapide non contrôlée dans les vapeurs d'azote (Bahadur *et al.*, 2000). Enfin, certaines études explorent la voie de la vitrification du tissu testiculaire sur un faible nombre de patients (Curaba *et al.*, 2011 ; Poels *et al.*, 2013).

	n	Age	Indication	Conditions	Cryoprotecteurs	Paramètres histologiques évalués	Résultats
<b>Bahadur et al. (2000)</b>	2	8 et 13 ans	2 pathologies malignes (L : 1 ; S : 1)	Congélation rapide non contrôlée <i>Seeding</i> (-)	Glycérol 10% Glycérol 10% Sérum patient 10% Propanediol 1,5 mol/L Sucrose 0,1 mol/L	Non explorés	-
<b>Kvist et al. (2006)</b>	8	12 - 66 mois	Cryptorchidie	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (+) 2 milieux de transport (Leibovitz vs PBS)	EG 1,5 mol/L Sucrose 0,1 mol/L HSA 10 mg/ml	<b>Tissu congelé vs frais</b> Culture tissulaire (2 semaines) [Nécrose cellulaire - Concentration en spermatogonies - Concentration en testostérone]	Morphologie = similaire Production hormonale = similaire
<b>Keros et al. (2007)</b>	5	2 - 14 ans	3 pathologies malignes (LA : 2, S : 1) dont 2 GSCH	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (+) 2 courbes de descente en température	DMSO 0,7 mol/L HSA 10 mg/mL	<b>Tissu congelé vs frais</b> Culture organotypique (24 heures) [Nécrose cellulaire - Concentration en spermatogonies et cellules de Sertoli]	<b>Descente en température la plus lente</b> Morphologie = similaire Nombre de spermatogonies = similaire
<b>Wyns et al. (2007)</b>	11	2 - 12 ans	Cryptorchidie	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (+)	DMSO 0,7 mol/L Sucrose 0,1 mol/L HSA 10 mg/mL	<b>Tissu congelé vs frais</b> Xénogreffe (6 mois) [Intégrité tissulaire (semi-quantitatif) - Concentration et prolifération des spermatogonies et des cellules de Sertoli]	Intégrité tissulaire conservée Diminution des spermatogonies, prolifération en augmentation Concentration similaire en cellules de Sertoli, prolifération en augmentation

**Tableau IV** : Revue de la littérature sur la congélation du tissu testiculaire chez le garçon pré-pubère

**HSA** : Human Serum Albumine, **DMSO** : Diméthylsulfoxyde, **EG** : Ethylène Glycol, **GSCH** : Greffe de cellules souches hématopoïétiques, **L** : Lymphome, **LA** : Leucémie aigüe, **MO** : Microscopie Optique, **ME** : Microscopie électronique à transmission, **n** : nombre de patients, **N** : Neuroblastome, **S** : Sarcome, **SCO** : Sertoli cell-only, **CSS** : cellules souches spermatogoniales, **TC** : Tumeur Cérébrale, **TESE** : Testicular Sperm Extraction, **TUNEL** : Terminal deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP nick-end labeling

	n	Age	Indication	Conditions	Cryoprotecteurs	Paramètres histologiques évalués	Résultats
<b>Wyns et al. (2008)</b>	5	7 - 14 ans	Pathologies non précisées 5 GSCH	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (+)	DMSO 0,7 mol/L Sucrose 0,1 mol/L HSA 10 mg/mL	<b>Tissu congelé vs frais</b> Xénogreffe (6 mois) [Intégrité tissulaire (semi-quantitatif en MO et en ME) - Concentration, prolifération et différenciation des spermatogonies - TESE - Apoptose (CASPASE-3 activée, TUNEL)]	Intégrité tissulaire conservé (MO, ME) Persistance et prolifération des spermatogonies Présence de cellules pré-méiotiques et spermatocytes I (stade pachytène)
<b>Ginsberg et al. (2010)</b>	14	3 mois - 14 ans	14 pathologies malignes (N : 4, S : 9, A : 1) GSCH non précisée	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (+)	DMSO 0,7 mol/L HSA 10 mg/mL	Non explorés	-
<b>Curaba et al. (2011)</b>	2	6 et 12 ans	1 pathologie maligne (LA) GSCH non précisée	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (+) vs vitrification	<b>Congélation lente</b> DMSO 0,7 mol/L Sucrose 0,1 mol/L HSA 10 mg/mL <b>Vitrification</b> DSMO 2,8 mol/L EG 2,8 mol/L HSA 25 mg/mL	<b>Tissu congelé</b> Culture organotypique (10 jours) [Survie et prolifération des spermatogonies]	Résultats similaires
<b>Wyns et al. (2011)</b>	62	12 - 16 ans	51 pathologies malignes (LA : 21, L : 12, N : 1, S : 12, TC : 3, Autres : 2) dont 15 GSCH	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (+)	DMSO 0,7 mol/L Sucrose 0,1 mol/L HSA 10 mg/ml	<b>Tissu frais</b> Présence de spermatogonies	<b>Garçons pré-pubères</b> 18% des tissus riches en spermatogonies <b>Garçons péri-pubères</b> 66,7% des tissus riches en spermatogonies

**Tableau IV (suite) :** Revue de la littérature sur la congélation du tissu testiculaire chez le garçon pré-pubère

**HSA :** Human Serum Albumine, **DMSO :** Diméthylsulfoxyde, **EG :** Ethylène Glycol, **GSCH :** Greffe de cellules souches hématopoïétiques, **L :** Lymphome, **LA :** Leucémie aigüe, **MO :** Microscopie Optique, **ME :** Microscopie électronique à transmission, **n :** nombre de patients, **N :** Neuroblastome, **S :** Sarcome, **SCO :** Sertoli cell-only, **CSS :** cellules souches spermatogoniales, **TC :** Tumeur Cérébrale, **TESE :** Testicular Sperm Extraction, **TUNEL :** Terminal deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP nick-end labeling

	n	Age	Indication	Conditions	Cryoprotecteurs	Paramètres histologiques évalués	Résultats
<b>Babayev et al. (2013)</b>	9	1 - 13 ans	4 pathologies malignes (LA : 1, L : 1, S : 1, TC : 1) GSCH non précisée	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (+)	DMSO 1,5 mol/L Sucrose 0,5 mol/L Sérum patient 10%	Non explorés	-
<b>Poels et al. (2013)</b>	10	2 - 12 ans	9 pathologies malignes (LA : 2, L : 1, N : 1, S : 3, TC : 2) dont 4 GSCH	Congélation lente contrôlée vs vitrification <i>Seeding</i> (+)	<b>Congélation lente</b> DMSO 0,7 mol/L Sucrose 0,1 mol/L HSA 10 mg/mL <b>Vitrification</b> DMSO 15 % EG 15% Sucrose 0,5 M HSA 25 mg/mL	<b>Tissu congelé (congélation lente ou vitrification) vs frais (in vivo ou après greffe)</b> Xénogreffe (6 mois) [Nombre de spermatogonies par tubule]	Diminution du nombre de spermatogonie/tubule après greffe Nombre de spermatogonie/tube et prolifération similaire entre tissu greffé frais, congelé ou vitrifié
<b>Goossens et al. (2013)</b>	47	-	17 pathologies malignes (LA : 8, L : 1, N : 1, S : 3, TC : 2, Autres : 2) GSCH non précisée	Congélation lente non contrôlée <i>Seeding</i> (-)	DMSO 1,5M Sucrose 0,1M	Non explorés	-
<b>Ginsberg et al. (2014)</b>	48	-	36 pathologies malignes (N : 9, S : 27) dont 36 GSCH	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (+)	DMSO 0,7 mol/L HSA 10 mg/mL	Non explorés	-

**Tableau IV (suite) :** Revue de la littérature sur la congélation du tissu testiculaire chez le garçon pré-pubère

**HSA :** Human Serum Albumine, **DMSO :** Diméthylsulfoxyde, **EG :** Ethylène Glycol, **GSCH :** Greffe de cellules souches hématopoïétiques, **L :** Lymphome, **LA :** Leucémie aigüe, **MO :** Microscopie Optique, **ME :** Microscopie électronique à transmission, **n :** nombre de patients, **N :** Neuroblastome, **S :** Sarcome, **SCO :** Sertoli cell-only, **CSS :** cellules souches spermatogoniales, **TC :** Tumeur Cérébrale, **TESE :** Testicular Sperm Extraction, **TUNEL :** Terminal deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP nick-end labeling

	n	Age	Indication	Conditions	Cryoprotecteurs	Paramètres histologiques évalués	Résultats
<b>Pietzak et al. (2015)</b>	34	4 mois - 18 ans	21 pathologies malignes (N : 6, S : 13, Autres : 2) dont 21 GCSH	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (+)	DMSO 0,7 mol/L HSA 10 mg/mL	<b>Tissu frais</b> [Richesse en CSS et de spermatocytes I par tubule]	81,5% des patients avec CSS
<b>Sadri-Ardekani et al. (2016)</b>	24	8 mois - 16 ans	11 pathologies malignes (LA : 1, L : 1, N : 2, S : 3, TC : 2, Autres : 2) GCSH non précisée	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (-)	DMSO 5% HSA 5%	<b>Tissu frais</b> [Nombre et Prolifération des spermatogonies par tubule]	<b>Cancer</b> 2,3 spermatogonies/tubule 16,4% des spermatogonies en prolifération <b>Cryptorchidie</b> 1 spermatogonie/ tubule 30,7% des spermatogonies en prolifération
<b>De Michele et al. (2017)</b>	3	11 et 12 ans	2 pathologies malignes (S : 2) GCSH non précisée	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (+)	DMSO 0,7 mol/L Sucrose 0,1 mol/L HSA 10 mg/mL	<b>Tissu congelé</b> Culture organotypique (139 jours) [Intégrité tissulaire - Concentration, prolifération et différenciation des spermatogonies - Apoptose (CASPASE-3 clivée) - Maturation et fonctionnalité des cellules de Sertoli et de Leydig]	Diminution du nombre de spermatogonies Maintien de la prolifération des spermatogonies Fonctionnalité des cellules de Sertoli et de Leydig

**Tableau IV (suite) :** Revue de la littérature sur la congélation du tissu testiculaire chez le garçon pré-pubère

**HSA :** Human Serum Albumine, **DMSO :** Diméthylsulfoxyde, **EG :** Ethylène Glycol, **GCSH :** Greffe de cellules souches hématopoïétiques, **L :** Lymphome, **LA :** Leucémie aigüe, **MO :** Miroscopie Optique, **ME :** Microscopie électronique à transmission, **n :** nombre de patients, **N :** Neuroblastome, **S :** Sarcome, **SCO :** Sertoli cell-only, **CSS :** cellules souches spermatogoniales, **TC :** Tumeur Cérébrale, **TESE :** Testicular Sperm Extraction, **TUNEL :** Terminal deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP nick-end labeling



	n	Age	Indication	Conditions	Cryoprotecteurs	Paramètres histologiques évalués	Résultats
<b>Ho et al. (2017)</b>	46	4 mois - 17 ans	30 pathologies malignes (LA : 6, L : 4, N : 2, S : 10, Autres : 5) GCSH non précisée	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (+)	DMSO 0,7 mol/L Sucrose 0,1 mol/L HSA 10 mg/ml	Non explorés	-
<b>Poganitsch-Korhonen et al. (2017)</b>	37	5 mois – 16 ans	37 pathologies malignes	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (+) 2 courbes de descente en température	DMSO 0,7 mol/L HSA 10 mg/mL	<b>Tissu congelé</b> Patients ayant reçu des agents alkylants vs sans agents alkylants [Nombre de spermatogonies par section de tube - Proportion de tube présentant un SCO] Evaluation à l'âge adulte des paramètres spermatiques.	Diminution significative du nombre de spermatogonies par tube et de la proportion de tube SCO chez les patients sous agents alkylants. Diminution de la concentration en spermatozoïdes dans le recueil de sperme chez les patients ayant reçus des agents alkylants.
<b>Stukenborg et al. (2018)</b>	46	5 mois – 13 ans	18 pathologies malignes 14 pathologies non malignes 14 contrôles	Congélation lente contrôlée <i>Seeding</i> (+) 2 courbes de descente en température	DMSO 0,7 mol/L HSA 10 mg/mL	<b>Tissu congelé</b> Patients ayant reçu des agents alkylants vs sans agents alkylants vs hydroxyurée [Nombre de spermatogonies par section de tube - Proportion de tube présentant un SCO]	Diminution significative du nombre de spermatogonies par tube et de la proportion de tube SCO chez les patients sous agents alkylants ou hydroxyurée

**Tableau IV (suite) :** Revue de la littérature sur la congélation du tissu testiculaire chez le garçon pré-pubère

**HSA :** Human Serum Albumine, **DMSO :** Diméthylsulfoxyde, **EG :** Ethylène Glycol, **GSCH :** Greffe de cellules souches hématopoïétiques, **L :** Lymphome, **LA :** Leucémie aigüe, **MO :** Mircorsopie Optique, **ME :** Microscopie électronique à transmission, **n :** nombre de patients, **N :** Neuroblastome, **S :** Sarcome, **SCO :** Sertoli cell-only, **CSS :** cellules souches spermatogoniales, **TC :** Tumeur Cérébrale, **TESE :** Testicular Sperm Extraction, **TUNEL :** Terminal deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP nick-end labeling

## Évaluation de la qualité du tissu testiculaire

A notre connaissance, seules deux études se sont attachées à comparer la qualité du tissu testiculaire avant et après décongélation. Kvist *et al.* (2006) évaluent la surface nécrosée de tissu en post-décongélation de façon qualitative. En revanche, Keros *et al.* (2007) effectuent une évaluation quantitative plus approfondie du tissu *via* un système d'analyseur d'images afin de calculer la surface nécrosée par tube séminifère ainsi que la surface de tissu endommagé ou non endommagé. Le paramètre histologique habituellement évalué dans les autres études concerne la présence de spermatogonies dans le tissu testiculaire conservé. Les études évaluant de façon précise la qualité du tissu avant et après congélation sont donc exceptionnelles et avec des effectifs réduits. Une évaluation plus détaillée de l'impact de la congélation sur le tissu testiculaire est nécessaire pour justifier l'intégration plus systématique de cette procédure de préservation de la fertilité dans la prise en charge globale des enfants pré-pubères dans le champ du cancer.

Deux études rapportent l'effet des traitements reçus préalablement à la conservation du tissu testiculaire sur le nombre de spermatogonies par tube (Poganitsch- Korhonen *et al.*, 2017 ; Stukenborg *et al.*, 2018). Cependant, l'effectif de celles-ci reste faible. Le but de notre étude est donc de déterminer si le moment choisi actuellement pour poser l'indication de conservation du tissu testiculaire n'est pas trop tardif pour assurer l'utilisation de ce prélèvement à des fins de procréation après décongélation.

***L'objectif de cette étude*** a été de déterminer l'impact, d'une part, de la congélation sur la qualité structurelle du tissu testiculaire après décongélation (tissu congelé) et d'autre part, du traitement du cancer reçu préalablement à la congélation sur le nombre de spermatogonies présentes dans les tubes séminifères et sur leur capacité à proliférer (tissu frais et congelé). L'effet éventuel de l'âge ou de la pathologie a été étudié sur le tissu testiculaire frais.

# Matériels et méthodes

---

## Contexte de l'étude

L'étude de ce mémoire comprend deux cohortes. L'une formée de 54 patients issus d'une étude pilote prospective multicentrique appelée « PROSPERMA » (Protocole hospitalier de recherche clinique [PHRC] n° 2008/071/HP) menée de 01/10/2009 au 31/12/2012, dans seize centres initialement (Besançon, Caen, Clermont-Ferrand, Grenoble, Lille, Lyon, Nancy, Nantes, Paris [Cochin et Pitié-Salpêtrière], Rennes, Rouen, Schiltigheim, Toulouse, Tours et Bondy). Le protocole a reçu un avis favorable du Comité de Protection des Personnes Nord-Ouest I PP le 19/04/2009.

L'étude était proposée à une population de garçons âgés entre 1 et 16 ans atteints d'un cancer, avant conditionnement pour une allogreffe de CSH, soit par irradiation corporelle totale, soit par chimiothérapie aplasante, ou avant intensification thérapeutique avec autogreffe de CSH. Les patients avaient déjà reçu préalablement un traitement par chimiothérapie ou radiothérapie à risque faible ou modéré sur la fertilité future. Il s'agissait généralement de patients (*i*) en rechute de leur cancer après rémission, (*ii*) ayant une réponse incomplète au traitement initial, (*iii*) en reprise évolutive sous traitement. Pour les patients pubères, il pouvait s'agir de patients n'ayant pas bénéficié d'une conservation de spermatozoïdes préalablement à l'introduction du traitement du cancer, ou pour lesquels la conservation des spermatozoïdes n'a pas pu être effectuée (refus du recueil, échec au recueil, paramètres spermatiques très sévèrement altérés). Les patients mineurs ont consulté accompagnés de leurs parents dans les différents centres pour information et proposition de préservation de la fertilité par conservation de tissu testiculaire. Lors de la consultation, un consentement éclairé pour la préservation de la fertilité a été signé par les parents et les enfants en fonction de leur compréhension (généralement âge supérieur à 7 ans). Une information spécifique a été délivrée pour l'étude PROSPERMA et un consentement propre à l'étude a été recueilli dans les mêmes conditions que le consentement pour la préservation de la fertilité.

La seconde cohorte recueillie en rétrospectif entre le 01/10/2013 et le 31/12/2016 au sein du Laboratoire de Biologie de la Reproduction-CECOS du CHU de Rouen Normandie (Cohorte CHU Rouen : CCR) se compose de 37 patients rouennais respectant les mêmes critères d'inclusion que la cohorte précédente mais n'ayant pas été inclus initialement dans celle-ci. Ces deux cohortes ont été fusionnées pour augmenter la puissance statistique de l'analyse. L'inclusion des patients de la CCR dans l'étude présentée a reçu l'avis favorable du Comité pour les études en recherche non interventionnelle du CHU de Rouen Normandie.

## **Prélèvement chirurgical testiculaire**

Le prélèvement chirurgical testiculaire a été réalisé de manière bilatérale ou unilatérale sous anesthésie générale selon une technique standardisée proposée pour les biopsies testiculaires des hommes adultes infertiles présentant une azoospermie. Cette procédure associe une incision scrotale médiane, une ouverture des cavités vaginales, l'extériorisation des deux testicules, avec incision à la lame froide de l'albuginée testiculaire en zone avasculaire, à la convexité du testicule et le prélèvement entre un tiers et un quart du volume testiculaire en fonction de l'âge et du volume testiculaire du patient. Après hémostase de la tranche de section, l'albuginée est refermée. Cette intervention nécessite une hospitalisation post-opératoire courte d'un à deux jours en l'absence de complication.

## **Traitement et congélation du tissu testiculaire**

La biopsie testiculaire devait être immédiatement placée dans un milieu de transport composé de Leibovitz® (CM1L1500-0U, Eurobio, Courtaboeuf, France) maintenu à 4°C dans la glace fondante et transporté vers le laboratoire dans un délai n'excédant pas 30 minutes afin de minimiser les risques d'ischémie chaude. Chaque flacon était identifié par le nom et le prénom du patient, la date et l'heure du prélèvement et le côté du prélèvement (droit ou gauche).

Chaque biopsie testiculaire était découpée en petits fragments selon un abaque qui était fourni par notre laboratoire pour respecter un poids de 10 à 15 mg par fragment à

congeler. Sur l'ensemble des fragments obtenus, quatre fragments étaient destinés, si possible, pour les analyses tissulaires de l'étude sans compromettre le stock de fragments destinés au patient. Un fragment non congelé était fixé dans du formol à 10 % (F8775, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) pour l'analyse en anatomo-pathologie et l'identification de la présence de cellules cancéreuses. Un fragment non congelé était immédiatement placé dans le Bouin alcoolique (HT10132, Sigma Aldrich) durant 18 heures en vue de l'analyse histologique avant congélation (tissu frais). Les autres fragments étaient placés dans le milieu de congélation et congelés séparément en vue des analyses tissulaires qui étaient réalisées dans le cadre du protocole (tissu congelé).

Chaque fragment tissulaire était placé dans un cryotube contenant 1,5 mL de milieu de congélation. Celui-ci était constitué du milieu Leibovitz<sup>®</sup> (CM1L1500-0U, Eurobio, Courtaboeuf, France) supplémenté de 10 % de sérum décomplémenté du patient dans lequel était ajouté du diméthylsulfoxyde (DMSO : D8418, Sigma, Lyon, France), à la concentration finale de 1,5 M et du sucrose (S1888, Sigma, Lyon, France) à la concentration finale de 0,05 M. L'équilibration du tissu avec le cryoprotecteur s'est effectuée ensuite sous agitation pendant 30 minutes dans la glace (à 4°C) (Milazzo *et al.*, 2008). Le protocole de congélation proposé était un protocole qui suivait une courbe de descente en température lente et contrôlée à l'aide d'un appareil de congélation programmable selon la courbe de descente en température suivante : départ à 5°C, pente de 2°C/min jusqu'à une phase de stabilisation de la température d'une durée de 8 min à -9°C, pente de 0.3°C/min jusqu'à -40°C, pente de 10°C/min jusqu'à -140°C. Les cryotubes étaient plongés et conservés dans l'azote liquide à -196°C jusqu'à leur utilisation.

La décongélation était faite durant une minute à température ambiante, puis, durant 3 minutes dans un bain-marie à 30°C. Les fragments de tissu testiculaire étaient ensuite réhydratés. Pour ce faire, ils étaient transférés dans 4 bains successifs de 5 minutes avec une concentration décroissante en cryoprotecteurs [**bain n°1** : DMSO 1 M, sucrose 0,05 M, Sérum de veau fœtal (SVF) 10 % (CVFSVF0060U, Eurobio, Courtaboeuf, France), Leibovitz<sup>®</sup> (L5520, Sigma, Lyon, France), **bain n°2** : DMSO 0,5 M, sucrose 0,05 M, SVF 10 %, Leibovitz<sup>®</sup>, **bain n°3** : sucrose 0,05 M, SVF 10 %, Leibovitz<sup>®</sup> et **bain n°4** : SVF 10 %, Leibovitz<sup>®</sup>].

# Analyses histologiques

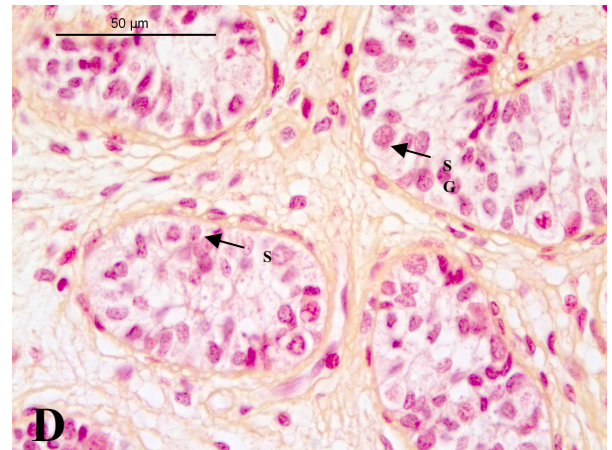
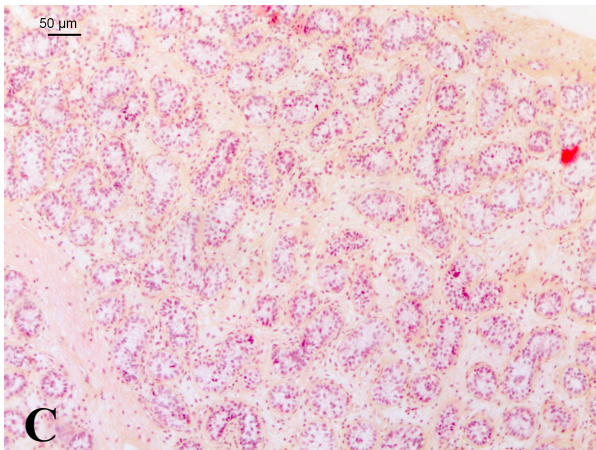
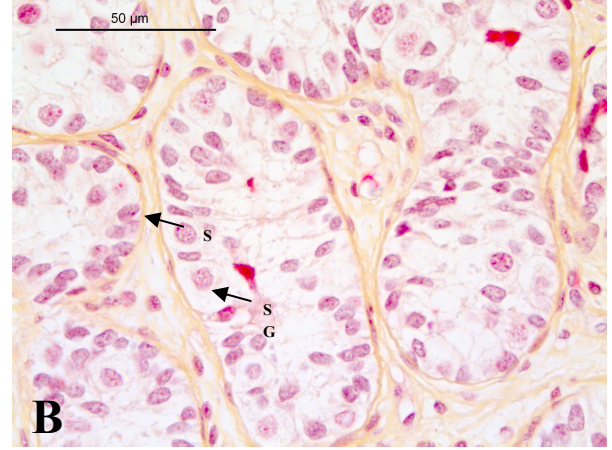
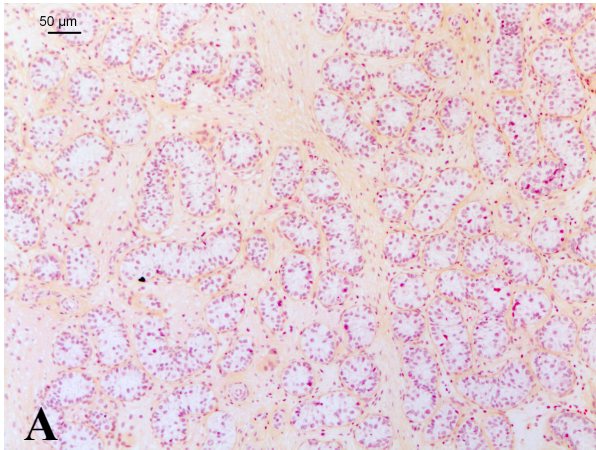
## Préparation des coupes histologiques

Les tissus testiculaires, frais ou décongelés ont été fixés dans le liquide de Bouin (HT10132, Sigma-Aldrich, Lyon, France) durant 18h, puis inclus en paraffine (Citadel 2000, Shandon, Asnières sur Seine, France). Des coupes d'une épaisseur de 3µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome (JungRM 2035, Leica, Nanterre, Allemagne) et déposées sur des lames polysines (Menzel-Gläser, Saarbrückener, Allemagne). Des bains successifs de xylène puis d'alcool à concentrations décroissantes ont été réalisés, respectivement pour déparaffiner puis réhydrater les coupes. Les lames ainsi obtenues ont ensuite été colorées à l'hémalun-éosine-safran (HES) ou utilisées pour des marquages immuno-histochimiques. L'étude morphométrique a été alors effectuée à l'aide d'un microscope droit à lumière blanche (DM 4000 B<sup>®</sup>, Leica, Mannheim, Allemagne) au grossissement ×500 à l'aide d'un logiciel LAS Module Mesures Interactives (LAS Core V2.4, Leica, Mannheim, Allemagne).

## Coloration à l'HES (Hémalun-Éosine-Safran)

Une première coloration a été faite dans l'Hémalun de Meyer (320550-1000, Socimed, Stains, France), qui colore spécifiquement la chromatine, puis dans un bain d'éosine (K1248035, Merck, Lyons, France) qui colore le cytoplasme et enfin le safran (Safran du Gatinais 1720-1203, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) qui colore le collagène. Après un dernier bain d'alcool puis de xylène, les lames ont été montées à l'Eukit (EUK 100, CML 717, Paris, France) sous lamelle (**Figure 2**).





**Figure 2** : Coupes histologiques de tissu testiculaire frais (**A** et **B**) ou congelé (**C** et **D**) de garçon pré-pubère en microscopie optique ( $\times 100$  [**A** et **C**] et  $\times 500$  [**B** et **D**]) colorées à l'HES (Hémalun, Eosine, Safran), l'hémalun pour la chromatine des cellules, l'éosine pour le cytoplasme, et le safran pour le collagène

## Marquages immuno-histochimiques

La numération des spermatogonies sur coupe, afin de déterminer la concentration, a été réalisée après marquage par anticorps anti-MAGE A4. Les spermatogonies sont les seules cellules à posséder les récepteurs antigéniques MAGE-A4 dans leur cytoplasme. Le marquage des spermatogonies en cours de prolifération cellulaire a, quant à lui, été effectué à l'aide d'un anticorps reconnaissant le PCNA ou Proliferating cell nuclear antigen (931143, PCNA Staining kit<sup>®</sup>, Invitrogen Life technologies, Carlsbad, Californie, États-Unis). Le PCNA est une cycline de 36 kDA qui joue, notamment, un rôle dans l'initiation de la prolifération cellulaire par l'intermédiaire de l'ADN polymérase. Le démasquage des sites antigéniques a été réalisé dans un tampon citrate 10 mM pH6 (T0043, Microstain division, Martinengo, Italy ; 10 mM, pH6) pendant 40 min pour le PCNA et le MAGE A4 au bain-marie à 96°C.

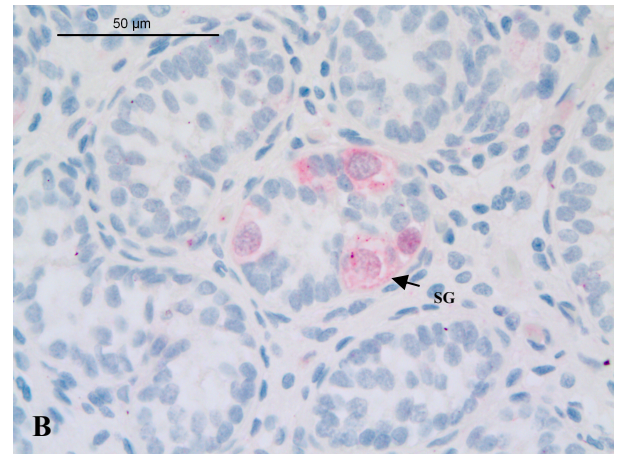
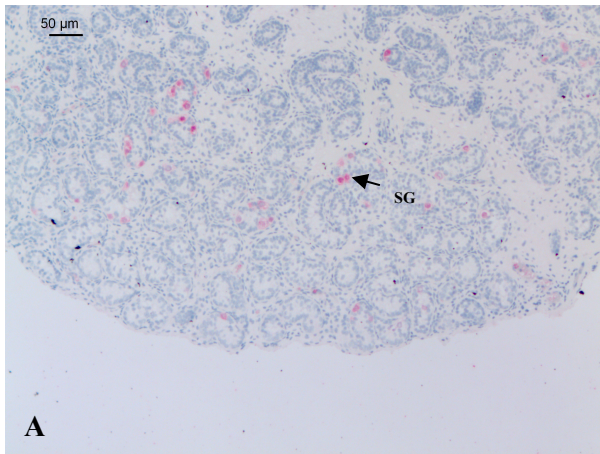
Pour le MAGE A4, les lames ont été ensuite placées toute une nuit avec les anticorps primaires anti-MAGE A4 (purifiés à partir de l'hybridome 57B, généreusement fourni par le docteur Giulio Spagnoli) dilués au  $1/1000^e$ . Les lames ont été ensuite trempées dans du Tris Buffered Saline contenant 10% de Tween-20 (TBST, F/T0083, Microm Microtech, Francheville, France) puis placées avec l'AP polymer (TL-015-APJ, ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) avant d'être nettoyées de nouveau avec le TBST. Elles ont ensuite été révélées en présence du substrat chromogène Fast Red Chromogen (TA-004-ALC, ThermoScientific) dilué au  $1/100^e$  dans le Liquid Fast Red Substrate (TA-015-ALS, ThermoScientific) (**Figure 3**).

Pour le PCNA, les lames ont été incubées avec l'anticorps anti-PCNA (PCNA Staining kit, 931143, Invitrogen Life Technologies) couplé à la biotine pendant 90 min, à température ambiante. La révélation a été effectuée à l'aide d'un complexe streptavidine-peroxydase et en présence d'un substrat chromogène DAB (931143, PCNA Staining kit<sup>®</sup>, Invitrogen Life technologies).

Après révélation, les coupes histologiques ont été contre-colorées à l'hématoxyline (Dako, France) et montées à l'Eukit (Eukit<sup>®</sup>, EUK 100, CML 717, France) sous lamelle (**Figure 4**).

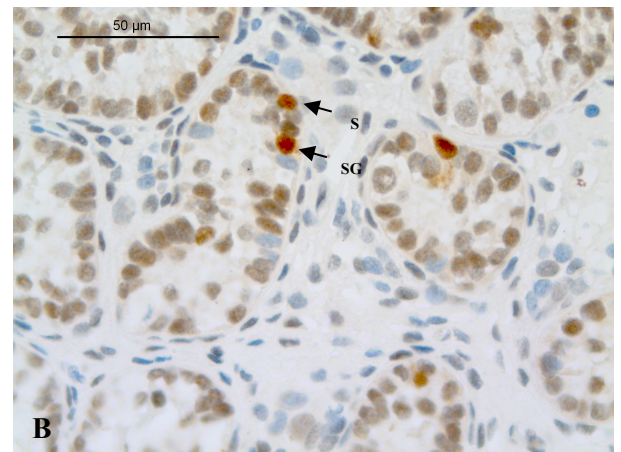
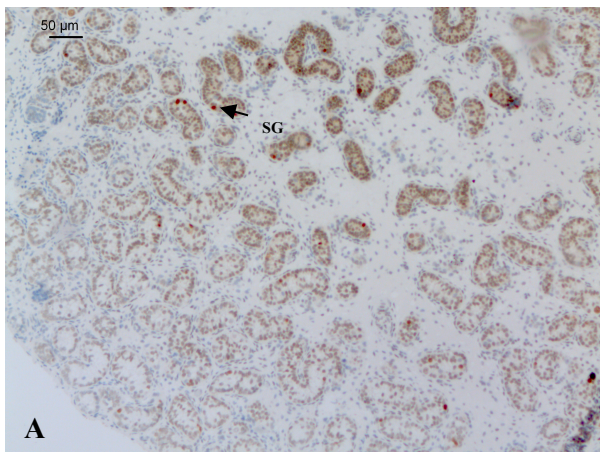
Des contrôles négatifs ont été réalisés en omettant l'anticorps primaire.





**Figure 3 :** Coupes histologiques de testicule de garçon pré-pubère en microscopie optique ( $\times 100$  [A] et  $\times 500$  [B]) marquées à l'aide de l'anticorps anti-MAGE-A4 (rose) pour les spermatogonies et à l'hématoxyline (bleue) pour les autres cellules

SG : Spermatogonie



**Figure 4 :** Coupes histologiques de testicule de garçon pré-pubère en microscopie optique ( $\times 100$  [A] et  $\times 500$  [B]) marquées à l'aide de l'anticorps anti-PCNA (marron) pour les spermatogonies ou les cellules de Sertoli avec capacité proliférative et à l'hématoxyline (bleue) pour les autres cellules

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen ; S : cellule de Sertoli ; SG : Spermatogonie

Sur les lames ayant bénéficié d'un immuno-marquage au PCNA, l'ensemble des tubes présents sur au moins deux coupes distinctes a été analysé, et toutes les spermatogonies, marquées ou non au PCNA, ont été comptabilisées. Seuls les noyaux fortement marqués ont été considérés comme positifs.

## Quantification des cellules germinales

La richesse du tissu en cellules germinales a été déterminée de deux façons différentes : en évaluant la concentration en spermatogonies dans le tissu par comptage sur coupe (stéréologie) et en estimant la proportion de tubes avec présence de cellules germinales immatures.

*La concentration en spermatogonies* a été déterminée sur coupe en mesurant la surface totale de la coupe analysée et la surface occupée par les tubes dans laquelle s'effectue le comptage des spermatogonies. La concentration en spermatogonies dépend du nombre de cellules germinales immatures comptées, de leur diamètre moyen, de la surface totale de la coupe, de la surface occupée par les tubes, de la surface de lecture ainsi que de l'épaisseur de la coupe. Elle se calcule de la façon suivante :  $C = (N \times 10^9) / VL$ , où **N** est le nombre de spermatogonies « entières » dans la zone de lecture et **VL**, le volume de lecture (en tenant compte du volume sans tube). **C** correspond au nombre de spermatogonies par mm<sup>3</sup> ou par mg dans la mesure où la densité de tissu testiculaire est voisine de 1.

Le calcul du *nombre de spermatogonies « entières »* dans la zone de lecture (**N**) se fait en utilisant l'équation de Floderus :  $N = (E \times n) / (E + (D - 2k))$ , où **n** est le nombre de spermatogonies comptées dans la zone de lecture, **E** l'épaisseur de la coupe (3 μm), **D** le diamètre moyen du noyau des spermatogonies (7 μm) et **k** l'épaisseur du plus petit segment de noyau visible et comptabilisé (0,7 μm) (Wing and Christensen, 1982).

Le diamètre moyen du noyau des spermatogonies a été obtenu en mesurant directement sur plusieurs coupes les sections les plus larges de ces cellules. L'épaisseur du plus petit segment de noyau visible a été considérée comme étant égal au dixième de la taille moyenne des noyaux comptés.

*Le nombre de spermatogonies par tube*, correspond en réalité au nombre de spermatogonies dénombrées dans 10 sections de tube (Paniagua and Nistal, 1984). Cette donnée nous permettra de comparer nos résultats avec des études réalisées par d'autres équipes (Poganitsch-Korhonen *et al.*, 2017 ; Stukenborg *et al.*, 2018).

Le volume de lecture, en tenant compte du volume sans tube, a été calculé de la façon suivante :  $VL = (E \times SL) / (1 - (S- / ST))$  où **E** est l'épaisseur de la coupe (3  $\mu\text{m}$ ), **SL** la surface de lecture, **S-** la surface « sans tube », et **ST** la surface totale de la coupe.

*La surface « sans tubes »* a par ailleurs, été divisée par la surface totale de la coupe afin d'estimer la proportion de tissu occupée par l'espace interstitiel.

## Morphométrie

Pour chaque testicule, l'analyse morphométrique des tubes séminifères a été réalisée sur une trentaine de coupes transversales à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images numérisées (LAS 2.8.1, Leica, Mannheim, Allemagne). Les paramètres suivants ont, à chaque fois, été mesurés : le diamètre (en  $\mu\text{m}$ ) et la surface (en  $\mu\text{m}^2$ ) des tubes, l'épaisseur de la paroi des tubes et de sa lame basale (en  $\mu\text{m}$ ), et enfin, le nombre de cellules intra-tubulaires (cellules germinales et de Sertoli). Les sections de tubes ont été considérées comme transversales lorsque le rapport du diamètre le plus grand sur le diamètre le plus petit était compris entre 1 et 1,5. Les densités cellulaires intra-tubulaires ont été calculées en étudiant le rapport du nombre de cellules intra-tubulaires sur la surface du tube, et, exprimées en nombre de cellules pour 1000  $\mu\text{m}^2$ .

## Évaluation semi-quantitative des altérations morphologiques

Les altérations morphologiques du tissu testiculaire décongelé ont été évaluées sur des coupes de tissu testiculaire colorées à l'hémalum-éosine-safran selon la procédure précédemment définie chez la souris (Milazzo *et al.*, 2008). Un score a été établi, tenant compte de l'aspect des noyaux des cellules intra tubulaires et de celui de l'épithélium. *Le score nucléaire* oscille entre 0 (normal) et 5 (altéré) : (i) la distinction entre le noyau des

cellules germinales et le noyau des cellules de Sertoli obtient un score de 0 si facile, 1 si difficile et 2 si impossible ; (ii) l'observation des nucléoles obtient un score de 0 si visibles dans plus de 50% des cellules et un score de 1 si visibles dans moins de 50% des cellules ; (iii) la condensation nucléaire obtient un score de 0 si aucun noyau n'est pycnotique, de 1 si pycnotiques dans moins de 50% des cellules et un score de 2 si pycnotiques dans plus de 50% des cellules. *L'altération de l'épithélium* est l'autre paramètre devant être pris en considération avec un score oscillant entre 0 (épithélium normal) et 5 (épithélium complètement altéré). Celui-ci fait état du détachement des cellules de la paroi des tubes séminifères (score compris entre 0 et 3) et de la formation de trous (score compris entre 0 et 2). La somme de toutes les altérations nucléaires et épithéliales définit *le score global*, celui-ci est compris entre 0 et 10 ; 0 correspondant à un tissu décongelé à morphologie parfaitement conservée et 10 à un tissu décongelé à morphologie complètement altérée.

## Traitements gonadotoxiques

### Dose cumulée d'agent de chimiothérapie

Chaque molécule de chimiothérapie est exprimée en dose cumulée reçue par mètre carré. La surface corporelle (SC, m<sup>2</sup>) a été calculée pour chaque enfant *via* deux formules ayant été validées selon les recommandations des réseaux de cancérologie :

$$SC = \sqrt{\frac{\text{Taille (cm)} \times \text{Poids (Kg)}}{3600}}$$

Ceci étant la formule la plus exacte pour évaluer la surface corporelle.

Néanmoins pour les enfants dont l'âge est inférieur à 3 ans et dont la taille n'était pas mentionnée dans le dossier médical, la formule suivante a été utilisée :

$$SC = \frac{4 \times \text{Poids (Kg)} + 7}{\text{Poids (Kg)} + 90}$$

*La dose cumulée* est exprimée en divisant la dose cumulée par la surface corporelle pour obtenir pour chacune des molécules une dose en g/m<sup>2</sup> ou UI/m<sup>2</sup>.

## « Cyclophosphamide equivalent dose » (CED)

La dose totale des agents de chimiothérapie et plus spécifiquement des agents alkylants est exprimée en dose totale cumulée/m<sup>2</sup>. Un algorithme a permis d'établir une échelle de référence de certains agents alkylants en fonction du Cyclophosphamide, grâce à une cohorte de patients guéris d'un cancer de l'enfance. L'article de Green *et al.*, (2014b) a démontré que la valeur de la CED était négativement corrélée à la concentration en spermatozoïdes dans une population de 12 954 patients ayant eu un cancer dans l'enfance et actuellement guéris. La CED exprimée en mg/m<sup>2</sup> est calculée par la somme des doses cumulées affectées d'un coefficient :

$$\begin{aligned} &1,0 \text{ [dose cumulée de cyclophosphamide (mg/m}^2\text{)]} \\ &+ 0,244 \text{ [dose cumulée d'ifosfamide (mg/m}^2\text{)]} \\ &+ 0,857 \text{ [dose cumulée de procarbazine (mg/m}^2\text{)]} \\ &+ 14,286 \text{ [dose cumulée de chlorambucil (mg/m}^2\text{)]} \\ &+ 15,0 \text{ [dose cumulée de BCNU (carmustine) (mg/m}^2\text{)]} \\ &+ 16,0 \text{ [dose cumulée de CCNU (lomustine) (mg/m}^2\text{)]} \\ &+ 40,0 \text{ [dose cumulée de melphalan (mg/m}^2\text{)]} \\ &+ 50,0 \text{ [dose cumulée de Thio-TEPA (mg/m}^2\text{)]} \\ &+ 100,0 \text{ [dose cumulée de moutarde azotée (mechloréthamine) (mg/m}^2\text{)]} \\ &+ 8,823 \text{ [dose cumulée de busulfan (mg/m}^2\text{)]} \end{aligned}$$

Nous avons considéré dans notre étude, cinq groupes de patients, à savoir les patients n'ayant pas reçu d'agent alkylant, les patients ayant reçu des agents alkylants mais ne faisant pas partie de la formule de la CED. Puis, trois groupes de doses croissantes de CED ont été déterminés : les patients ayant une CED supérieure à zéro mais inférieure de 4000 mg/m<sup>2</sup>, ceux compris entre 4000 et 8000 mg/m<sup>2</sup> et ceux supérieurs ou égaux à 8000 mg/m<sup>2</sup>

(Green *et al.*, 2014b; Poganitsch-Korhonen *et al.*, 2017), afin d'identifier une éventuelle relation entre la concentration en spermatogonies et les agents alkylants reçus.

## **Dose cumulée d'Anthracyclines**

En cancérologie courante, le facteur de conversion d'isotoxicité des anthracyclines est fréquemment utilisé, permettant d'obtenir la dose cumulée d'anthracyclines. Celui-ci utilise un facteur 1 pour la Doxorubicine et un facteur 0,833 pour la Daunorubicine (Poganitsch-Korhonen *et al.*, 2017 ; Stukenborg *et al.*, 2018).

## **Radiothérapie**

Pour les patients ayant bénéficié d'une radiothérapie, le champ d'irradiation, la durée, le nombre de séances, la dose cumulée totale en Grays, ainsi que la protection gonadique éventuelle ont été recueillis.

## Analyses statistiques

Les données colligées ont été analysées par le Docteur Mickael Bubenheim à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute, Cary, NC, Version 9.3). L'analyse a été complétée par la suite, au sein du laboratoire, à l'aide du logiciel GraphPad prism 7 (pour Mac OS X, GraphPad Software, Inc., Copyright 1994-2017, La Jolia, Californie, Etats-Unis, version 7.0c). Les données ont été décrites en utilisant les paramètres descriptifs habituels : moyenne, écart-type, médiane, étendue ou 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartile pour les variables quantitatives ; fréquences pour les variables qualitatives. Les variables descriptives sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type (min ; max). Les paramètres de l'analyse histologique sont exprimés en médiane [1<sup>er</sup> quartile ; 3<sup>ème</sup> quartile].

La comparaison des deux cohortes, PROSPERMA et CCR, est réalisée par un test de Student. L'évaluation de l'impact de la congélation est réalisée par un test de Friedman sur séries appariées. Les différents paramètres étudiés ont été comparés selon les différents types de pathologies tumorales par un test de Kruskal-Wallis et selon la présence ou l'absence d'agents alkylants par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney. L'étude de corrélation entre les différents paramètres étudiés, avec l'âge ou le CED, est réalisée grâce au calcul du tau de Kendall. Puis, l'analyse de comparaison en sous-groupes d'âge ou de CED a été faite *via* le test de Kruskal-Wallis. Les résultats sont considérés significatifs si  $p < 0,05$ .

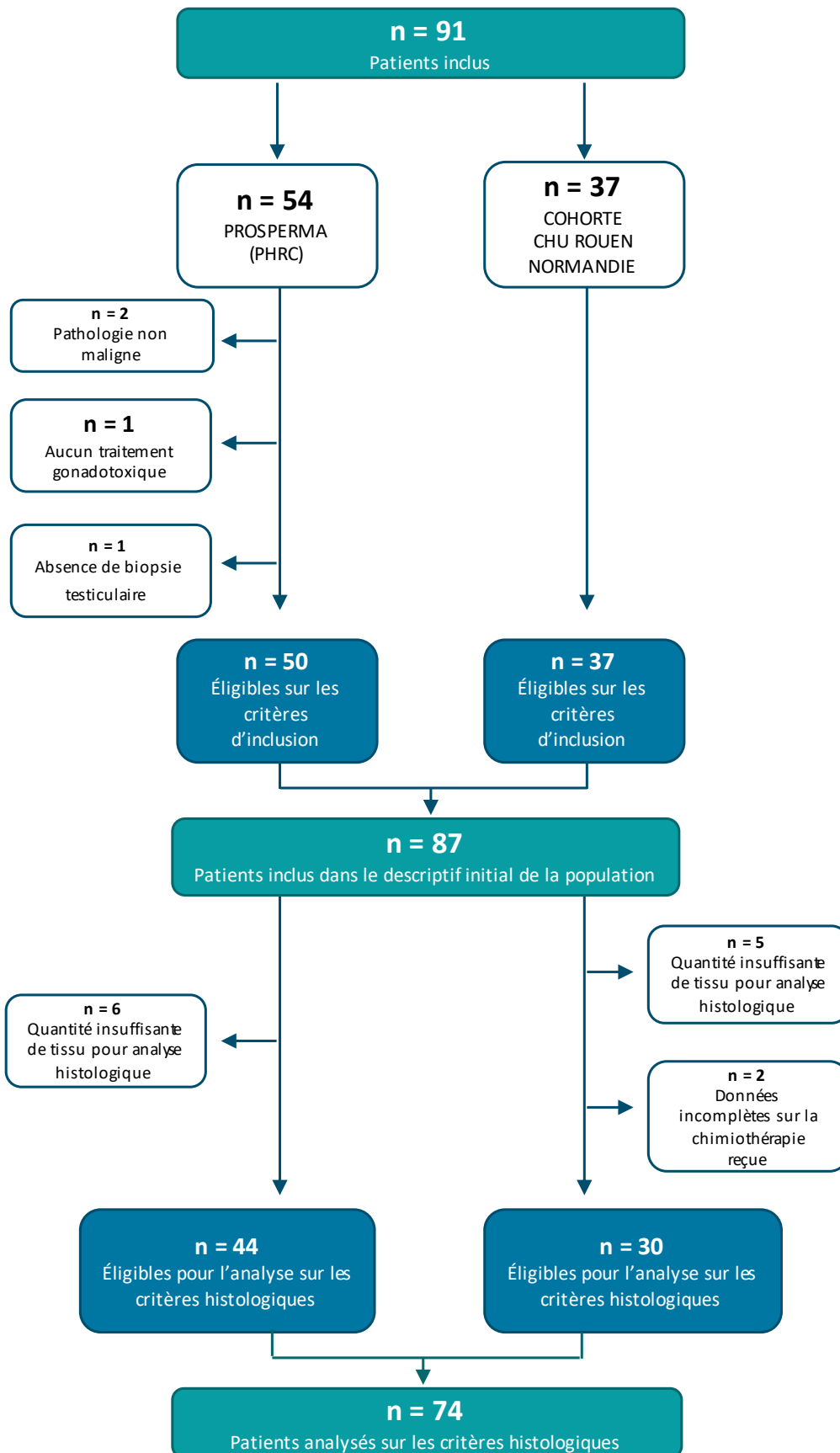
# Résultats

---

## Description de la population étudiée

Notre étude a inclus initialement 91 patients (PROSPERMA, n=54 ; CCR, n=37). Les patients de PROSPERMA étaient issus de huit Laboratoires de Biologie de la Reproduction-CECOS (Besançon, Caen, Clermont-Ferrand, Lille, Lyon, Nantes, Rouen et Toulouse) sur les seize centres initiaux. Quatre patients ont été exclus de PROSPERMA : deux patients présentaient une pathologie non maligne (Anémie de Blackfan Diamond ; Ostéopétrose) ; un patient n'avait pas reçu de chimiothérapie ou de radiothérapie préalablement au prélèvement chirurgical testiculaire ; un patient n'avait pas bénéficié d'une conservation de tissu testiculaire, l'allogreffe de CSH ayant été récusée secondairement. Parmi les 87 patients ayant bénéficié d'une chimiothérapie, une biopsie testiculaire bilatérale a été réalisée pour 82% (71/87) d'entre eux. La biopsie testiculaire unilatérale (18,4%, 16/87) était proposée systématiquement dans un centre PROSPERMA, en fonction du volume testiculaire dans un autre centre et en raison de l'envahissement tumoral par des cellules leucémiques du testicule controlatéral (CCR, n=1). L'analyse histologique comparée du tissu testiculaire avant congélation et après décongélation n'a pas pu être effectuée pour treize patients (PROSPERMA, n=6 ; CCR, n=5), en raison d'une quantité non suffisante de tissu testiculaire (n=11), et de données incomplètes sur les doses de chimiothérapie (CCR, n=2). La **Figure 5** représente le descriptif des patients éligibles pour l'étude.





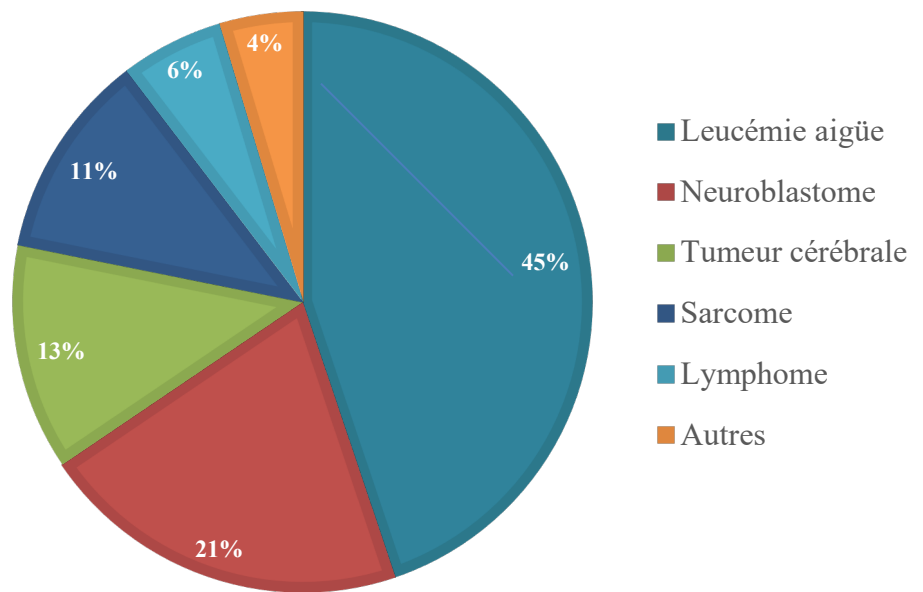
**Figure 5** : Descriptif des patients éligibles de l'étude

Les caractéristiques de la population de l'étude sont représentées dans la **Figure 6** et le **Tableau VI**, comprenant les 87 patients retenus pour le descriptif initial. Les populations PROSPERMA et CCR étaient comparables en termes d'âge, de surface corporelle, d'IMC, des types de pathologies présentées et du poids du fragment testiculaire prélevé, que ce soit à droite ou à gauche. Les patients étaient âgés de  $7 \pm 4$  ans (min : 8 mois ; max : 16 ans) dont 79,3% (69/87) étaient âgés de moins de 12 ans et 11,5% (10/87) de patients pubères. Quatre patients avaient un antécédent de cryptorchidie unilatérale (n=1) ou bilatérale (n=3), traitée chirurgicalement (n=2) ou descendue spontanément (n=2). Deux patients avaient été opérés d'une hernie inguinale unilatérale (n=1) ou bilatérale (n=1). Un patient avait été traité chirurgicalement pour une torsion du cordon spermatique gauche. Un patient avait une anomalie des organes génitaux externes (anomalie du prépuce, phimosis et palmure pénoscrotale). Six patients avaient un antécédent d'infection uro-génitale sans atteinte testiculaire ou des voies excrétrices spermatiques. Un épisode fébrile ( $>38^{\circ}\text{C}$ ) était survenu dans les trois mois précédents l'intervention chirurgicale pour 78% (68/87) des patients.

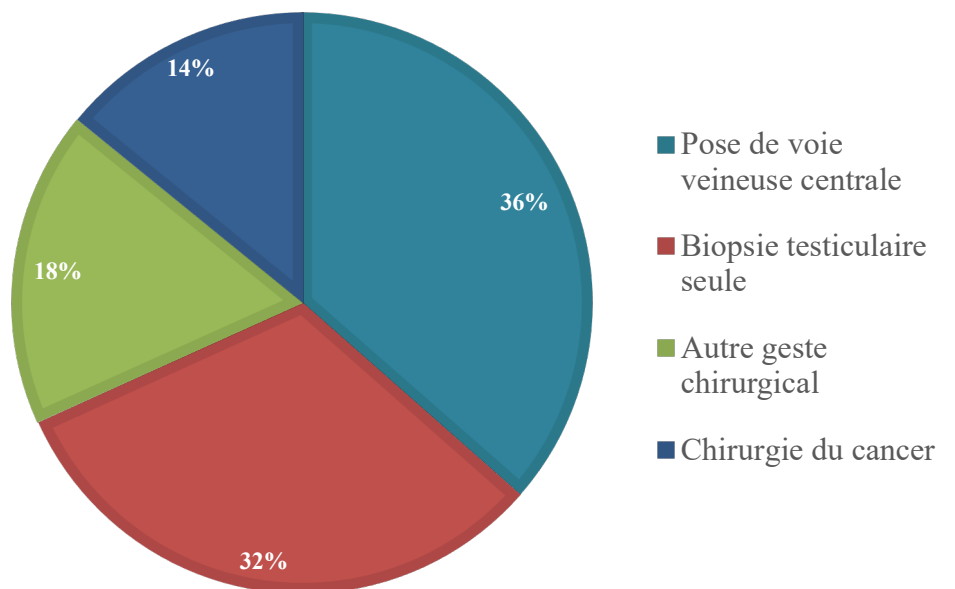
Un traitement chirurgical du cancer (tumeurs solides) avait été effectué chez 27,5% des patients (24/87) dont une orchidectomie gauche pour invasion leucémique. Le délai moyen entre la consultation pour préservation de la fertilité et la biopsie testiculaire était de  $20 \text{ jours} \pm 23$  (1 ; 105). La **Figure 7** présente les conditions de réalisation de la biopsie testiculaire, celle-ci devant normalement être réalisée lors d'un autre geste chirurgical, que ce soit la pose d'une voie veineuse centrale, une chirurgie du cancer ou un autre geste chirurgical. Ceci n'a pas été le cas pour 32% (27/87) des patients.

Un fragment testiculaire de 15 mg environ était destiné à une analyse anatomo-pathologique afin d'évaluer la présence de cellules malignes au sein du parenchyme testiculaire. Elle n'avait pas été réalisée pour 5,3% (8/151) des fragments testiculaires droits ou gauches, principalement en raison d'une quantité insuffisante de tissu. De plus, la présence de cellules malignes avait été observée pour 3 patients dont 2 de façon bilatérale.

Concernant le devenir des patients, 27,6% (24/87) sont décédés des suites de leur pathologie.



**Figure 6** : Répartition des patients en fonction de leur diagnostic simplifié



**Figure 7** : Répartition des gestes associés à la biopsie testiculaire

Variables	Population totale n= 87	PROSPERMA n= 50	CCR n= 37	Valeur de p	
<b>Age (années) au moment du consentement</b> Moyenne ± écart-type (min ; max)	7 ± 4 (0 ; 16)	6 ± 4 (0 ; 16)	8 ± 5 (0 ; 16)	0,2224	
<b>Surface corporelle (SC) (m<sup>2</sup>)</b> Moyenne ± écart-type (min ; max)	0,9 ± 0,4 (0,4 ; 1,8)	0,9 ± 0,4 (0,4 ; 1,8)	0,9 ± 0,4 (0,4 ; 1,8)	0,4362	
<b>Indice de masse corporelle (IMC) (kg/m<sup>2</sup>)</b> Moyenne ± écart-type (min ; max)	16,4 ± 3,2 (11,6 ; 26,4)	16,3 ± 3 (12,2 ; 26,4)	16,5 ± 3,4 (11,6 ; 26,4)	0,6872	
<b>Délai entre la consultation et la biopsie (jours)</b> Moyenne ± écart-type (min ; max)	20 ± 23 (1 ; 105)	19 ± 24 (1 ; 104)	21 ± 23 (1 ; 105)	0,5899	
<b>Délai entre la dernière cure de chimiothérapie et la biopsie (jours)</b>	75 ± 336 (0 ; 3080)	32 ± 44 (2 ; 328)	134 ± 514 (0 ; 3080)	0,1627	
<b>Poids du fragment testiculaire droit prélevé (mg ; n = 80)</b>	347,2 ± 471,8 (14,7 ; 3392)	409,9 ± 606,8 (18,0 ; 3392)	274,4 ± 220,9 (14,7 ; 930)	0,2020	
<b>Poids du fragment testiculaire gauche prélevé (mg ; n= 71)</b>	343,1 ± 426,9 (10,0 ; 2856)	371,7 ± 537,1 (35,0 ; 2856)	315,5 ± 287,6 (10,0 ; 1556)	0,5820	
<b>Diagnostic</b>	<i>Leucémie aigüe lymphoblastique</i>	25 (28,7%)	14 (28%)	11 (29,7%)	-
	<i>Leucémie aigüe myéloblastique</i>	14 (16,2%)	8 (16%)	6 (16,2%)	-
	<i>Lymphome non hodgkinien</i>	3 (3,5%)	1 (2%)	2 (5,4%)	-
	<i>Lymphome hodgkinien</i>	2 (2,4%)	1 (2%)	1 (2,7%)	-
	<i>Sarcome d'Ewing</i>	7 (8%)	5 (10%)	2 (5,4%)	-
	<i>Sarcome myéloïde</i>	1 (1,1%)	1 (2%)	-	-
	<i>Sarcome rhabdoïde</i>	1 (1,1%)	-	1 (2,7%)	-
	<i>Ostéosarcome</i>	2 (2,4%)	-	2 (5,4%)	-
	<i>Neuroblastome</i>	18 (20,7%)	16 (32%)	2 (5,4%)	-
	<i>Médulloblastome</i>	11 (12,6%)	3 (6%)	8 (21,6%)	-
	<i>Néphroblastome</i>	1 (1,1%)	-	1 (2,7%)	-
	<i>Tératome immature</i>	1 (1,1%)	1 (2%)	-	-
	<i>PNET</i>	1 (1,1%)	-	1 (2,7%)	-

**Tableau VI** : Caractéristiques de la population étudiée (CCR : Cohorte du CHU de Rouen Normandie)

Une valeur de  $p < 0,05$  est significative

IMC : indice de masse corporelle ; PNET : Tumeur neuroectodermique primitive ; SC : surface corporelle

## Les traitements reçus

Sur les 74 patients retenus pour l'analyse, 87,8% (65/74) d'entre eux ont bénéficié d'une chimiothérapie seule ; pour 12,2 % patients (9/74), celle-ci était associée à une radiothérapie dont un seul patient avec une irradiation abdominale. Le délai entre la dernière cure de chimiothérapie et la biopsie testiculaire était de 23 jours [15 ; 35], le délai entre la dernière séance de radiothérapie et la biopsie testiculaire était de 44 jours [39 ; 119]. Les différentes chimiothérapies sont présentées dans le **Tableau VIII** avec le pourcentage de patients traités pour chacune des molécules de chimiothérapie, ainsi que la médiane des doses reçues pour chacune des molécules. Trois enfants ont reçu jusqu'à treize molécules différentes de chimiothérapie. Au total, 86,5% (64/74) des patients ont reçu un traitement incluant des agents alkylants. La CED a été calculée pour chacun des patients. La médiane de la CED des patients est de 4561,3 [2980 ; 8154] mg/m<sup>2</sup>. De plus, 23% (17/74) des patients ont bénéficié d'un traitement par Cisplatine et 12,2% (9/74) des patients ont reçu du Carboplatine comme seul agent alkylant, ces deux molécules ne faisant pas partie de la formule du CED.

La dose calculée cumulée d'Anthracyclines (DCA) présentait une médiane de 203,2 [118,5 ; 273,1] mg/m<sup>2</sup> ; 81,8% (45/55) des patients ayant reçu des agents alkylants, inclus dans la formule de la CED, avaient reçu des anthracyclines, et aucune différence significative de la dose cumulée d'anthracyclines entre les groupes avec ou sans alkylants n'a été retrouvée ( $p = 0,0897$ ). En revanche, l'analyse au sein des trois groupes de dose de CED retrouve une augmentation significative de la dose reçue d'anthracyclines dans le groupe avec la CED la plus élevée ( $\geq 8000$  mg/m<sup>2</sup>) ( $p = 0,0028$ ) (**Tableau VII**).

Enfin, 12,2% (9/74) des patients ont bénéficié d'une radiothérapie, dont 5,4% (4/74) en région abdominale et 4% (3/74) en région céphalique. Cependant, aucune différence n'a été retrouvée sur les différents paramètres étudiés et ne seront donc pas développés dans la suite de l'exposé.

	Dose cumulée d'Anthracyclines		
	Échantillons	Médiane [1 <sup>er</sup> Q ; 3 <sup>ème</sup> Q] mg/m <sup>2</sup>	Valeur de <i>p</i> modalité (< 4000 = référence)
CED < 4000	15	160,6 [99,6 ; 236,3]	<i>Ref.</i>
4000 < CED < 8000	17	122,1 [97,2 ; 207,2]	0,5583
CED ≥ 8000	13	296,5[166,3 ; 313,3]	<b>0,0097</b>
Valeur de <i>p</i> (effet)	-	<b>0,0028</b>	-

**Tableau VII** : Dose cumulée d'Anthracyclines en fonction du groupe de CED

Une valeur de  $p < 0,05$  est significative

**CED** : Cyclophosphamide Equivalent Dose ; **Q** : Quartile

Classe de chimiothérapie		DCI	Patients n= 74 (%)	Dose cumulée Médiane [1 <sup>er</sup> Q ; 3 <sup>ème</sup> Q] mg/m <sup>2</sup>	
Intercalants	Inhibiteur topoisomérase I	<i>Irinotécan</i>	2 (2,7%)	227,6 [227,6 ; 401,3]	
		<i>Topotécan</i>	5 (6,8%)	14,6 [14,3 ; 14,8]	
	Inhibiteur topoisomérase II	Anthracycline	<i>Daunorubicine</i>	28 (37,8%)	163,7 [123,2 ; 251,1]
			<i>Doxorubicine</i>	35 (47,3%)	122,1 [89,4 ; 201,9]
			<i>DCA</i>	52 (70,3%)	203,2 [118,5 ; 273,1]
		Autres	<i>Amsacrine</i>	8 (10,8%)	246,7 [228 ; 282,5]
			<i>Bléomycine</i>	3 (4,1%)	40,4 [38,1 ; 162,35]
			<i>Dactinomycine</i>	6 (8,1%)	7,72 [1,48 ; 10,96]
			<i>Etoposide</i>	66 (89,2%)	1023,3 [750,5 ; 1524,8]
			<i>Mitoxantrone</i>	16 (21,6%)	29,9 [16,3 ; 49,6]
Alkylants	Inclus dans la CED	<i>Cyclophosphamide</i>	46 (62,2%)	3796,2 [2331,5 ; 5323,5]	
		<i>Ifosfamide</i>	24 (32,4%)	8923,5 [3800,5 ; 27042]	
		<i>Lomustine</i>	1 (1,4%)	109,9	
		<i>Thiotépa</i>	2 (2,7%)	52,6 [52,6 ; 778,9]	
		<i>Procarbazine</i>	1 (1,4%)	2140,3	
		<i>Melphalan</i>	1 (1,4%)	84,65	
		<i>Busulfan</i>	1 (1,4%)	860,7	
		<i>CED</i>	64 (86,5%)	4561,3 [2980 ; 8154]	
		Non inclus dans la CED	<i>Cisplatine</i>	17 (23%)	317 [223,1 ; 349,1]
			<i>Carboplatine</i>	28 (37,8%)	1513 [1273,7 ; 1621,1]
	<i>Dacarbazine</i>		1 (1,4%)	4038	
	<i>Temozolomide</i>		2 (2,7%)	684,7 [684,7 ; 1003,3]	
	Antimétabolites	<i>Cytarabine</i>	35 (47,3%)	19338 [8727,1 ; 28710]	
		<i>Mercaptopurine</i>	15 (20,3%)	3535,6 [1398 ; 14221]	
<i>Methotrexate</i>		33 (44,6%)	10201 [259,74 ; 23137]		
<i>Nelarabine</i>		5 (6,8%)	6404,1 [6399,4 ; 6535,9]		
<i>Fludarabine</i>		5 (6,8%)	300,2 [294,2 ; 311,4]		
<i>Thioguanine</i>		13 (17,6%)	1917,3 [884,5 ; 2280,3]		
<i>Gemcitabine</i>		1 (1,4%)	7364,7		
Agents du fuseau	<i>Vinblastine</i>	4 (5,4%)	22,57 [14,7 ; 23,1]		
	<i>Vincristine</i>	47 (63,5%)	11 [8,3 ; 19]		
	<i>Vindesine</i>	16 (21,6%)	7,8 [5,9 ; 10,2]		
	<i>Docétaxel</i>	1 (1,4%)	504,3		
Inhibiteur de la synthèse protéique		<i>L-Asparaginase</i>	29 (39,2%)	81386 [11041 ; 121237] *	
Cytokine		<i>Aldesleukine</i>	3 (4,1%)	94 [19,9 ; 179,6]	

**Tableau VIII** : Caractéristiques des agents de chimiothérapie reçus par les patients

\* valeur en UI/m<sup>2</sup> ; une valeur de  $p < 0,05$  est significative

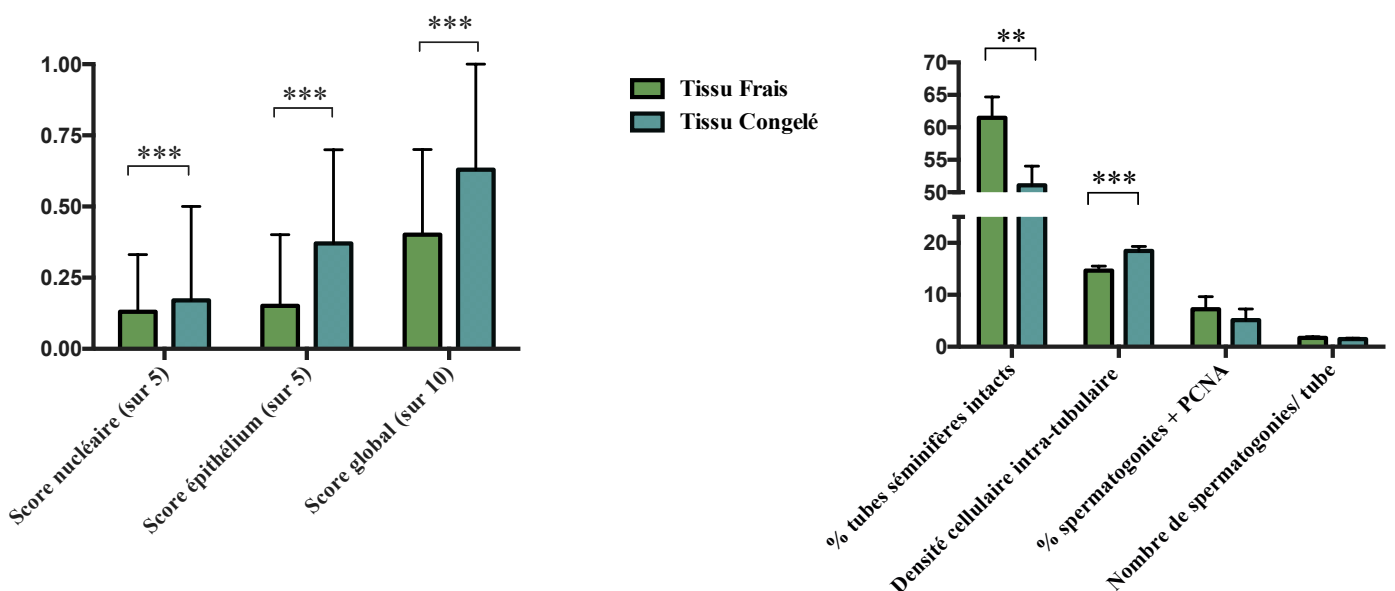
**CED** : Cyclophosphamide Equivalent Dose ; **DCA** : Dose Cumulée d'Anthracyclines ;

**DCI** : Dénomination commune internationale **Q** : Quartile

# Évaluation histologique du tissu testiculaire

## Effet de la congélation sur le tissu testiculaire

Les effets de la congélation sur le tissu testiculaire sont reportés dans le **Tableau IX**. *Le score nucléaire, épithélial ou tissulaire global augmente après décongélation de façon significative et ce, quel que soit le coté concerné ( $p < 0,0001$ ) (Figure 8). Le score global reste inférieur ou égal à 1. Le pourcentage de tubes séminifères intacts diminue sur le tissu congelé ( $p = 0,0001$ ). Le pourcentage de spermatogonies en prolifération et le nombre de spermatogonies par tube ne sont toutefois pas différents entre ces tissus ( $p = 0,7819$  et  $p = 0,6568$ ), à noter que la densité cellulaire intra-tubulaire ( $N/1000\mu m^2$ ) augmente après décongélation ( $p < 0,001$ ) et qu'aucune différence entre les côtés de la biopsie, droit ou gauche, n'a été retrouvée, ceci était valable pour les tissus frais ou congelés. Par conséquent, dans la suite de l'analyse, nous avons considéré uniquement les valeurs des différents paramètres histologiques issus du testicule droit frais.*



**Figure 8** : Effet de la congélation sur les scores lésionnels et l'évaluation cellulaire dans le tissu testiculaire décongelé

\*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$



		Échantillons	Médiane [1 <sup>er</sup> Q ; 3 <sup>ème</sup> Q]	Valeur <i>p</i> modalité (Frais droit = référence)
<b>Score nucléaire (Sur 5)</b>	<i>Frais droit</i>	71	0,13 [0,03 ; 0,33]	<i>Ref.</i>
	<i>Frais gauche</i>	62	0,13 [0,03 ; 0,28]	0,3763
	<i>Congelé droit</i>	67	0,17 [0,06 ; 0,50]	<b>0,0013</b>
	<i>Congelé gauche</i>	54	0,17 [0,00 ; 0,47]	<b>0,0474</b>
	Valeur <i>p</i> (effet)	-	<b>0,0099</b>	-
<b>Score épithélium (Sur 5)</b>	<i>Frais droit</i>	71	0,15 [0 ; 0,4]	<i>Ref.</i>
	<i>Frais gauche</i>	62	0,1 [0 ; 0,33]	0,6394
	<i>Congelé droit</i>	67	0,37 [0,07 ; 0,7]	<b>0,0016</b>
	<i>Congelé gauche</i>	54	0,27 [0,07 ; 0,7]	<b>0,0067</b>
	Valeur <i>p</i> (effet)	-	<b>&lt; 0,0001</b>	-
<b>Score tissulaire global (Sur 10)</b>	<i>Frais droit</i>	71	0,4 [0,2 ; 0,7]	<i>Ref.</i>
	<i>Frais gauche</i>	62	0,33 [0,13 ; 0,75]	0,7855
	<i>Congelé droit</i>	67	0,63 [0,37 ; 1]	<b>&lt; 0,0001</b>
	<i>Congelé gauche</i>	54	0,5 [0,33 ; 2]	<b>0,0056</b>
	Valeur <i>p</i> (effet)	-	<b>&lt; 0,0001</b>	-
<b>Pourcentage de tubes séminifères intacts</b>	<i>Frais droit</i>	71	70 [40 ; 83,3]	<i>Ref.</i>
	<i>Frais gauche</i>	62	68,3 [46,7 ; 86,7]	0,5716
	<i>Congelé droit</i>	67	50 [33,3 ; 66,7]	<b>0,0012</b>
	<i>Congelé gauche</i>	54	60 [30 ; 73,3]	<b>0,0433</b>
	Valeur <i>p</i> (effet)	-	<b>0,0001</b>	-
<b>Densité cellulaire intra-tubulaire (N/ 1000 µm<sup>2</sup>)</b>	<i>Frais droit</i>	71	13,8 [11,3 ; 17,8]	<i>Ref.</i>
	<i>Frais gauche</i>	62	14,3 [10,9 ; 18,2]	0,1451
	<i>Congelé droit</i>	67	18,0 [14,8 ; 22,8]	<b>&lt; 0,0001</b>
	<i>Congelé gauche</i>	54	18,0 [12,7 ; 25,3]	<b>&lt; 0,0001</b>
	Valeur <i>p</i> (effet)	-	<b>&lt; 0,0001</b>	-
<b>Pourcentage de spermatogonies exprimant le PCNA (%)</b>	<i>Frais droit</i>	71	0,0 [0,0 ; 3,8]	<i>Ref.</i>
	<i>Frais gauche</i>	62	0,0 [0,0 ; 5,6]	0,4497
	<i>Congelé droit</i>	67	0,0 [0,0 ; 1,7]	0,3532
	<i>Congelé gauche</i>	54	0,0 [0,0 ; 5,4]	1,0
	Valeur <i>p</i> (effet)	-	0,7819	-
<b>Nombre de spermatogonies/ Tube</b>	<i>Frais droit</i>	71	1,3 [0,4 ; 2,2]	<i>Ref.</i>
	<i>Frais gauche</i>	62	1,2 [0,4 ; 1,8]	0,1985
	<i>Congelé droit</i>	67	1,1 [0,3 ; 2,4]	1,0
	<i>Congelé gauche</i>	54	0,9 [0,2 ; 1,7]	0,3428
	Valeur <i>p</i> (effet)	-	0,6568	-

**Tableau IX** : Effet de la congélation sur l'architecture des tubes séminifères après décongélation

Une valeur  $p < 0,05$  est significative

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen ; Q : Quartile

## Effet de la pathologie tumorale sur le tissu testiculaire

La **Figure 9** représente le nombre de spermatogonies par tube séminifère et la CED en fonction du type de cancer simplifié.

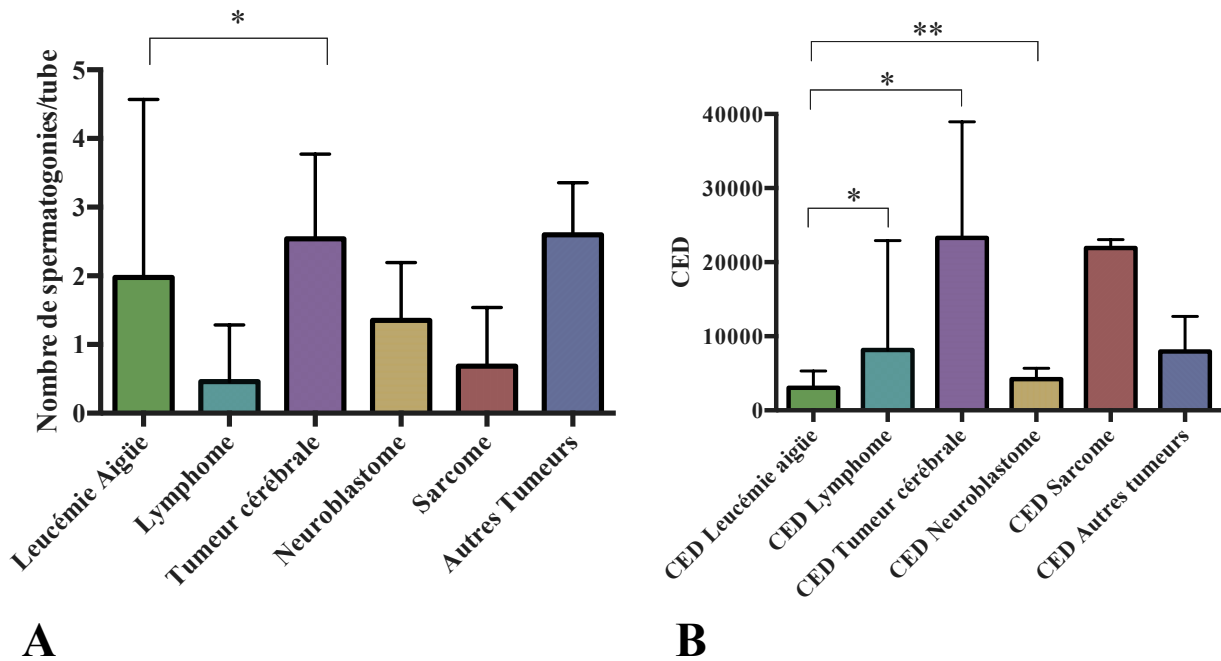
*Le nombre de spermatogonies par tube* était supérieur pour les patients avec tumeur cérébrale (2,3 [1,7 ; 3,3] ;  $p = 0,0334$ ), inversement, la diminution du nombre de spermatogonies par tube pour les autres types de cancer n'était pas significative (**Figure 9A**).

*Le pourcentage de tubes séminifères sans cellule, le nombre de spermatogonies par surface totale de tube ( $\mu\text{m}^2$ ) et la concentration en spermatogonies ( $10^3/\text{mm}^3$ )* sont significativement différents en fonction du type de cancer sans pouvoir identifier un type particulier de cancer ( $p = 0,0487$ ,  $p = 0,0345$  et  $p = 0,0393$ ). *Le pourcentage de fibrose interstitielle* n'était pas différent en fonction du type de cancer ( $p = 0,9444$ ).

Cependant, nous observons des CED plus élevées pour les lymphomes (8152 [5074,8 ; 8197,7]  $\text{mg}/\text{m}^2$  ;  $p = 0,0209$ ), les tumeurs cérébrales (7593,9 [7593,9 ; 38947]  $\text{mg}/\text{m}^2$  ;  $p = 0,0275$ ) et les sarcomes (14904 [11356 ; 23060]  $\text{mg}/\text{m}^2$  ;  $p = 0,0051$ ) par comparaison aux leucémies aiguës.

## Effet de l'âge sur le tissu testiculaire

Aucune corrélation n'a été observée entre *le nombre de spermatogonies par tube* et l'âge ( $r = -0,075$  ;  $p > 0,05$ ) ou entre *le pourcentage de spermatogonies en prolifération* et l'âge ( $r = -0,054$  ;  $p > 0,05$ ). Pour autant, la comparaison en sous-groupes d'âge (< 3 ans ; 3 à 6 ans ; 6 à 12 ans et > 12 ans) démontre un lien entre *la concentration en spermatogonies* et l'âge mais ce lien est non monotone ( $p = 0,0036$ ). En effet, celle-ci augmente jusqu'à l'âge de 12 ans puis diminue dans le sous-groupe d'âge supérieur à 12 ans. Ce lien est aussi retrouvé pour le pourcentage de tubes avec spermatogonies ( $p = 0,0189$ ). Les autres paramètres histologiques étaient, à l'inverse, non significatifs.



**Figure 9** : Evaluation du nombre de spermatogonies par tube séminifère et de la CED en fonction du type de cancer

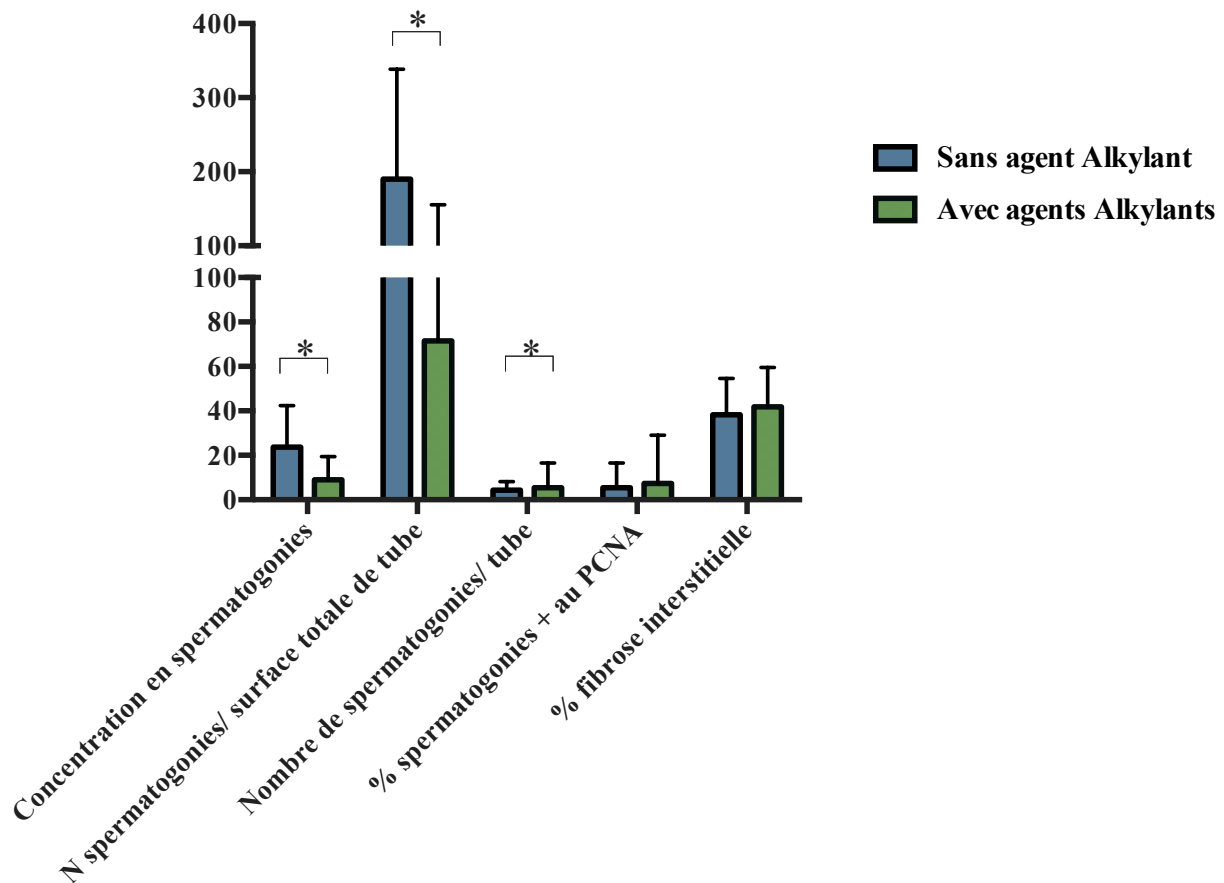
**A** : Nombre de spermatogonies intra-tubulaires en fonction de la pathologie ; **B** : CED en fonction de la pathologie (mg/m<sup>2</sup>)

**CED** : Cyclophosphamide equivalent dose

\*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$

## Effet des agents alkylants sur le tissu testiculaire

La concentration en spermatogonies par mg de tissu ( $10^3/\text{mg}$ ) est plus faible dans le groupe de patients ayant reçu des agents alkylants (Patients sans agent alkylant : 36,7 [6,66 ; 33,31] vs Patients avec agents alkylants : 4,74 [6,66 ; 33,31] ;  $p = 0,0178$ ). Il en est de même pour le nombre de spermatogonies par surface totale de tube ( $\mu\text{m}^2$ ) (Patients sans agent alkylant : 250,58 [175,07 ; 443,62] vs Patients avec agents alkylants 68,13 [14,49 ; 202,2] ;  $p = 0,0144$ ), et le nombre de spermatogonies par tube (Patients sans agent alkylant : 2,9 [1,4 ; 6,3] vs Patients avec agents alkylants 1,3 [0,3 ; 2,0] ;  $p = 0,0353$ ) (Figure 10).



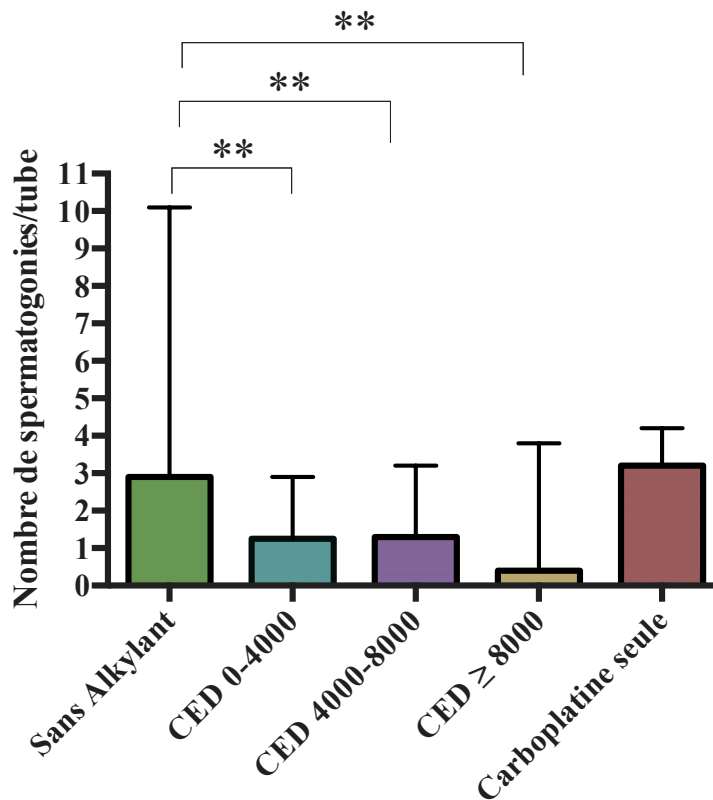
**Figure 10** : Comparaison des effets des agents alkylants sur différents paramètres d'évaluation du tissu testiculaire

\*  $p < 0,05$

Aucune différence significative du *pourcentage de spermatogonies en prolifération* n'est retrouvée selon les traitements des patients (Patients sans agent alkylant : 0 [0 ; 3,2] vs Patients avec agents alkylants 0 [0 ; 3,8] ;  $p = 0,6081$ ), ainsi que sur *le pourcentage de fibrose interstitielle* (Patients sans agent alkylant 36,7 [29,9 ; 42,0] vs Patients avec agents alkylants 45,5 [28,7 ; 55,0] ;  $p = 0,4316$ ).

Une analyse en sous-groupes a été réalisée sur les doses de CED des patients et les différents paramètres étudiés. Aucune différence significative n'a été observée entre les doses de CED et la concentration en spermatogonies ( $p = 0,6144$ ), le nombre de spermatogonies par surface totale de tube ( $p = 0,5053$ ), le pourcentage de spermatogonies en prolifération ( $p = 0,7665$ ). Ces paramètres ont tous tendance à diminuer avec l'augmentation des doses de CED, sans atteindre cependant la significativité. *Le nombre de spermatogonies par tube*, quant à lui, était diminué en fonction des doses de CED (Patients sans agent alkylant : 2,9 [0,9 ; 8] vs CED à ]0 - 4000[ : 1,25 [0,55 ; 1,575],  $p = 0,001$  ; vs CED à ]4000 - 8000[ : 1,3 [0,2 ; 2],  $p = 0,001$  ; vs CED  $\geq 8000$  : 0,4 [0 ; 1,9],  $p = 0,001$ ). En revanche, on ne note aucune différence significative entre les patients n'ayant pas reçu d'agents alkylants et les patients ayant reçu du Carboplatine seule (2,9 [0,9 ; 8] vs 3,2 [1,75 ; 3,35] ;  $p = 0,1$ ) (**Figure 11**).

Nous avons pu observer, dans la cohorte, huit patients présentant une absence totale de spermatogonies, de manière unilatérale droite pour trois patients ou bilatérale pour cinq autres. Dans le **Tableau X** sont reportés différents paramètres cliniques et biologiques de ces patients. La CED était supérieure à 8000 mg/m<sup>2</sup> pour quatre des patients avec une absence bilatérale de spermatogonies. Cependant, le cinquième patient avait reçu une chimiothérapie faiblement gonadotoxique, n'incluant ni agent alkylant, ni radiothérapie.



**Figure 11** : Nombre de spermatogonies par tube en fonction des doses d'agents alkylants reçus

CED : Cyclophosphamide equivalent dose ( $\text{mg}/\text{m}^2$ )

\*\*  $p < 0,01$

Age (années)	Diagnostic	ATCD	Coté atteint	[Spermatogonies] $10^3/\text{mm}^3$	CED $\text{mg}/\text{m}^2$	Radiothérapie	Dose Gy
1	Neuroblastome	-	Unilatéral droit	0,153	4875	-	-
11	LH	-	Unilatéral droit	0,096	3613	-	-
15	LAL	-	Unilatéral droit	0,054	4587	Abdominale	12
9	Sarcome d'Ewing	-	Bilatéral	-	21922	Céphalique	54
11	Sarcome d'Ewing	-	Bilatéral	-	23000	Thoracique	54
12	LH	Cryptorchidie droite Hernie inguinale bilatérale	Bilatéral	-	8153	-	-
13	LAL	-	Bilatéral	-	18355	-	-
13	LAM	-	Bilatéral	-	-	-	-

**Tableau X** : Description des patients avec absence totale de spermatogonie, unilatérale ou bilatérale

ATCD : Antécédents ; Gy : Grays ; LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique ; LH : Lymphome Hodgkinien ; LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde

# Discussion

---

A notre connaissance, il s'agit de la cohorte la plus importante rapportée dans la littérature étudiant l'impact de la congélation et du traitement du cancer reçu, sur la qualité du tissu testiculaire après décongélation et la concentration en spermatogonies dans le cadre de la conservation du tissu testiculaire. Bien qu'il soit difficile d'évaluer l'impact de chaque molécule de chimiothérapie, il semble très nettement ressortir que l'introduction d'agents alkylants et ce, quelle que soit la dose reçue, a un impact négatif sur la concentration en spermatogonies. Nous démontrons également que le processus de congélation-décongélation développé par notre laboratoire n'affecte pas l'architecture des tubes séminifères et leur contenu.

## Impact de la congélation sur le tissu testiculaire

A travers cette étude, nous avons pu démontrer que le nombre de spermatogonies par tube séminifère ainsi que leur prolifération n'étaient pas affectés par notre protocole de congélation, infirmant ainsi les résultats obtenus par une étude réalisée chez 10 patients pré-pubères et utilisant un protocole de congélation lente contrôlée avec seeding, qui observe une diminution du nombre de spermatogonies par tube séminifère après décongélation (Poels *et al.*, 2013). De plus, si les conditions de congélation sont optimales, l'expression du PCNA s'en trouve inchangée après décongélation, comme cela a été rapporté par notre équipe sur le tissu testiculaire de souris pré-pubère après décongélation utilisant le même protocole de congélation proposé dans notre étude (Milazzo *et al.*, 2010). Ce résultat est en faveur d'une bonne conservation de l'aptitude des spermatogonies à proliférer et potentiellement à se différencier. Il faut cependant noter une absence d'expression du PCNA pour de nombreux patients jeunes, à la fois sur le tissu frais et le tissu congelé, provoquant ainsi un biais potentiel d'interprétation. En revanche, une augmentation de la densité cellulaire intra-tubulaire post-décongélation était observée, ce qui peut être lié à une réhydratation non complète du tissu testiculaire après décongélation, responsable d'une augmentation artéfactuelle de cette densité. La conservation satisfaisante de l'architecture

des tubes séminifères et la présence d'altérations tissulaires modérées avec un score lésionnel tissulaire global inférieur à 1 après décongélation, nous portent à croire que la congélation lente contrôlée sans seeding, initialement développée sur le tissu testiculaire chez la souris pré-pubère (Milazzo *et al.*, 2008) et peu rapportée dans la littérature (Sadri- Ardekani *et al.*, 2016), permet une bonne conservation du tissu testiculaire pré-pubère ou pubère humain.

## Impact des traitements sur le tissu testiculaire

A l'instar de travaux rapportés par d'autres équipes (Nurmio *et al.*, 2009 ; Green *et al.*, 2014b ; Poganitsch-Korhonen *et al.*, 2017 ; Stukenborg *et al.*, 2018), nous avons pu observer une diminution du nombre de spermatogonies dans le tissu testiculaire dès l'introduction d'agents alkylants à haut risque gonadotoxique. L'effet des agents alkylants est évalué dans notre étude à l'aide de la formule du CED utilisée et améliorée dans des travaux précédents (Green *et al.*, 2010, 2014a, 2014b). Les auteurs avaient démontré une corrélation négative entre la dose de CED reçue et la concentration en spermatozoïdes chez 214 patients adultes guéris d'un cancer traité dans l'enfance (médiane de l'âge : 7,7 ans [0,01-20,3]) et pour lesquels une analyse des paramètres spermatiques avait été effectuée à un âge de 29,0 ans [18,4-56,1]. Cette corrélation négative n'a pas été retrouvée, dans notre cohorte, entre la concentration en spermatogonies et la CED. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette différence de résultats : (i) un effectif trop faible par sous-groupe de dose, (ii) des facteurs génétiques qui peuvent moduler la sensibilité individuelle au traitement (Green *et al.*, 2014b), certains patients ayant reçu une CED très élevée conservaient paradoxalement une concentration en spermatogonies très satisfaisantes, (iii) un traitement du cancer non achevé avec un délai court (23 jours [15-35]) entre la dernière cure de chimiothérapie et la conservation du tissu testiculaire ne permettant pas d'évaluer l'impact réel du traitement reçu sur les spermatogonies. Une évaluation de marqueurs de l'apoptose précoce (Caspase 3 clivée) et tardive (TUNEL) au sein des spermatogonies permettrait une approche plus qualitative et plus adaptée dans l'évaluation des effets précoces des agents alkylants sur les spermatogonies.

Cependant, le nombre de spermatogonies par tube diminuait de manière significative en fonction des doses de CED, avec une diminution proche de 60% pour une CED inférieure



à 8000 mg/m<sup>2</sup> et proche de 90% pour une CED supérieure ou égale à 8000 mg/m<sup>2</sup>. Nos résultats sont en accord avec d'autres données de la littérature. Des altérations des paramètres spermatiques sont plus fréquemment observées chez des patients guéris d'un cancer de l'enfance pour une CED supérieure à 4000 mg/m<sup>2</sup> sans que l'on puisse définir un seuil prédictif d'azoospermie non obstructive post-traitement (Green *et al.*, 2014b). Une CED supérieure à 5000 mg/m<sup>2</sup> (Chow *et al.*, 2016) ou un score AAD (alkylating agent dose score) supérieur ou égal 3 (Wasilewski-Masker *et al.*, 2014) sont également associés à une probabilité diminuée de concevoir une grossesse. Plus récemment, une diminution du nombre de spermatogonies a été observée chez des patients pré-pubères avec une CED supérieure à 4000 mg/m<sup>2</sup> en fin de traitement d'une leucémie aigüe lymphoblastique (Poganitsch-Korhonen *et al.*, 2017).

En revanche, la formule utilisée pour le calcul de la CED n'inclut pas les agents alkylants modérément gonadotoxiques, tels que les sels de platine (Cisplatine et Carboplatine). Bien que le Carboplatine soit modérément gonadotoxique et ce quelle que soit la dose, le Cisplatine, quant à lui est fortement gonadotoxique pour des doses dépassant les 600 mg/m<sup>2</sup> (Wyns *et al.*, 2010). Dans notre cohorte, treize patients ont bénéficié d'une chimiothérapie par Cisplatine mais aucun n'avait reçu une dose cumulée supérieure à 600 mg/m<sup>2</sup> et tous recevaient d'autres agents alkylants faisant partie de la formule de la CED, réduisant ainsi le biais dans notre analyse et surtout l'impact sur le tissu testiculaire. L'étude de Green *et al.* (2014a) confirme l'absence d'effet du Cisplatine sur la concentration de spermatogonies. D'autre part, neuf patients ont reçu du Carboplatine comme seul agent alkylant, mais la comparaison de ce groupe avec les patients ne recevant aucun agent alkylant n'a pas permis d'identifier de différence sur l'ensemble des paramètres spermatogoniaux. Aucun effet additionnel des anthracyclines n'a été identifié, si ce n'est le constat que la dose cumulée était plus élevée dans le groupe des CED  $\geq$  8000 mg/m<sup>2</sup>, comme cela a été retrouvé par Poganitsch-Korhonen *et al.* (2017) et Stukenborg *et al.* (2018). Il reste difficile d'évaluer l'impact spécifique de chaque molécule puisque les traitements combinent plusieurs agents de chimiothérapie.

Un prélèvement testiculaire bilatéral était proposé dans le cadre de notre étude afin de limiter la quantité de tissu prélevé sur chacun des testicules, d'augmenter la quantité de spermatogonies en vue de leur conservation et de réduire les risques de recueil infructueux. Trois patients n'avaient pas de spermatogonies de manière unilatérale avec une

CED  $\geq$  4000 mg/m<sup>2</sup>, l'un d'entre eux avait reçu également une radiothérapie abdominale avec une dose cumulée de 12 Gy. Le prélèvement bilatéral a permis d'éviter le recueil infructueux. Néanmoins, cinq autres patients ne présentaient aucune spermatogonie de manière bilatérale, expliquée par une CED  $\geq$  8000 mg/m<sup>2</sup> pour quatre d'entre eux et non explicable pour le dernier patient qui avait reçu une chimiothérapie faiblement gonadotoxique (**Tableau X**). Certains patients pris en charge peuvent avoir des facteurs de risque additionnels d'altération de la spermatogenèse, comme la cryptorchidie, bilatérale pour l'un de nos patients ou d'une autre étiologie pour le cinquième patient.

Dans la littérature, le prélèvement se fait principalement de façon unilatérale (Bahadur *et al.*, 2000 ; Kvist *et al.*, 2006 ; Wyns *et al.*, 2007, 2008, 2011 ; Curaba *et al.*, 2011 ; Babayev *et al.*, 2013 ; Poels *et al.*, 2013 ; De Michele *et al.*, 2017 ; Ho *et al.*, 2017). Notre étude appuie donc l'importance de réaliser le prélèvement de façon bilatérale, ce d'autant qu'une étude récente montre l'absence de retentissement sur la taille des testicules 12 mois après la biopsie par comparaison à un groupe contrôle du même âge (Uijldert *et al.*, 2017).

## Impact du type de pathologie tumorale sur le tissu testiculaire

La répartition des pathologies tumorales dans notre cohorte est assez représentative de l'épidémiologie des pathologies tumorales retrouvées dans la littérature. Toutefois, une proportion plus importante de patients ayant un neuroblastome était retrouvée avec 21% de notre cohorte vs 8,4% dans la littérature (Desandes *et al.*, 2016). Tous ces patients présentaient un neuroblastome de stade IV. Or, à ce stade, une chimiothérapie intensive suivie d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques est souvent proposée (Talleur *et al.*, 2017). L'indication de conservation de tissu testiculaire se pose donc rapidement dans ce contexte. Wyns *et al.* (2011) retrouvent une répartition de leur population d'étude sensiblement similaire à la nôtre, hormis la présence d'un seul patient atteint d'un neuroblastome.

Dans notre étude, un effet de la pathologie tumorale était retrouvé pour la concentration en spermatogonies, le nombre de spermatogonies par surface totale et le

pourcentage de tubes séminifères sans cellule, mais sans pour autant identifier la pathologie responsable de cette significativité (**Figure 9**). Ceci est dû au faible effectif en sous-groupe de pathologie. Cependant, les CED étaient supérieures pour les patients atteints de lymphome, sarcome et tumeur cérébrale. Pour ce dernier groupe de pathologie, les résultats sont probablement biaisés car deux patients avaient reçu des doses extrêmement élevées d'agents alkylants ( $> 8000 \text{ mg/m}^2$ ). En revanche, pour les patients atteints de lymphome ou de sarcome, les groupes étaient plus homogènes pour les doses d'agents alkylants. Enfin, les patients atteints d'une tumeur cérébrale avaient un *nombre de spermatogonies intratubulaires* supérieur aux autres groupes de pathologies tumorales. En effet, dans ce groupe, huit patients sur dix avaient reçu uniquement du Carboplatine comme seul agent alkylant, molécule modérément gonadotoxique (Wyns *et al.*, 2010).

Des altérations des paramètres spermatiques conventionnels ont été rapportées chez les hommes consultant pour conservation de spermatozoïdes avant traitement d'un cancer et ne présentant pas de facteur de risque d'infertilité (Rives *et al.*, 2012 ; Bujan *et al.*, 2013 ; Caponecchia *et al.*, 2016 ; MacKenna *et al.*, 2017). Elles sont observées à la fois pour le cancer du testicule et les autres types de cancer (Bussen *et al.*, 2004).

Un effet local du cancer lorsqu'il est testiculaire (compression du tissu sain par la tumeur, micro-environnement inflammatoire) ou un effet systémique (altération de l'état général, inflammation, hyperthermie, dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire) peuvent expliquer le dysfonctionnement testiculaire (Caponecchia *et al.*, 2016).

Malgré cela, l'impact de la pathologie est difficile à évaluer de manière isolée lorsque le patient a déjà reçu un traitement considéré comme faiblement gonadotoxique. En effet, même si les traitements des patients sont individuels, des schémas généraux de chimiothérapie sont retrouvés pour une même pathologie. L'effet des pathologies est ainsi associé à l'effet des traitements et *vice versa*. Dans la littérature, aucune évaluation de l'effet de la pathologie tumorale sur le tissu testiculaire n'a été effectuée, dans le cadre de la conservation de celui-ci.

## Impact de l'âge sur le tissu testiculaire

Aucune corrélation n'a été retrouvée entre l'âge des patients et le nombre de spermatogonies par tube ou le pourcentage de spermatogonies en prolifération, donnée également retrouvée, pour ce qui est du nombre de spermatogonies par tube, par l'équipe de Nurmio *et al.* (2009). En revanche, cette étude retrouvait une diminution du pourcentage de spermatogonies en prolifération avec l'âge. Toutefois, l'analyse en sous-groupes d'âge de notre étude montre une variation significative de la concentration en spermatogonies. Cette évolution de la concentration en spermatogonies suit celle rapportée par Masliukaite *et al.* (2016) avec des valeurs plus faibles de concentration en spermatogonies avant 3 ans, une augmentation entre 3 et 6 ans pour atteindre une valeur plateau jusqu'à 12 ans. Les concentrations diminuées observées, dans notre étude, chez les patients de plus de 12 ans sont dues à quatre patients sur quatorze n'ayant pas de spermatogonie de manière unilatérale (n=1) ou bilatérale (n=3).

# Conclusion

---

Notre étude démontre l'absence d'impact de notre protocole de congélation lente contrôlée sans *seeding* sur la qualité du tissu testiculaire après décongélation, la quantité et l'aptitude à proliférer des spermatogonies. Nous démontrons également que le nombre de spermatogonies par tube est diminué lorsque le patient reçoit un traitement par chimiothérapie incluant des agents alkylants et ceci quelle que soit la dose reçue. Cependant, une CED > 8000 mg/m<sup>2</sup> est associée à une diminution drastique du nombre de spermatogonies. Ces données sont intéressantes pour orienter les oncologues pédiatres dans la proposition de conservation de tissu testiculaire qui devrait être envisagée préférentiellement dès que la CED prévisionnelle serait supérieure à 4000 mg/m<sup>2</sup>. Il existe, à l'heure actuelle, peu d'études disponibles concernant l'impact de la congélation, de la chimiothérapie et de la radiothérapie sur le testicule pré-pubère humain. Malgré notre effectif conséquent, notre étude doit encore être améliorée par l'ajout d'un nombre plus important de patients du même âge et atteints de la même pathologie et à traitement équivalent.

Lors de la conservation du tissu testiculaire, nos patients sont informés des utilisations ultérieures possibles, comme le stipule *l'arrêté du 8 juillet 2017* relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation « Certaines possibilités thérapeutiques sont de développement récent et justifient qu'une information spécifique sur l'état des connaissances et sur les résultats des éventuels protocoles de recherche en cours soit délivrée ». Les différentes stratégies envisageables à l'heure actuelle en termes d'utilisation du tissu testiculaire pré-pubère, qu'il s'agisse de la greffe de tissu testiculaire, de la transplantation de cellules germinales ou de la spermatogenèse *in vitro*, sont toutes du domaine de la recherche et les chances de succès de celles-ci seront, entre autres, conditionnées par la richesse en spermatogonies souches du tissu testiculaire conservé (Poganitsch-Korhonen *et al.*, 2017 ; Stukenborg *et al.*, 2018). A notre connaissance, aucune équipe n'a, à ce jour, rapporté l'utilisation du tissu testiculaire congelé en vue de restaurer la fertilité d'un patient guéri durant l'enfance et devenu adulte.

# Références Bibliographiques

---

Babayev SN, Arslan E, Kogan S, Moy F, Oktay K. Evaluation of ovarian and testicular tissue cryopreservation in children undergoing gonadotoxic therapies. *J Assist Reprod Genet* 2013;**30**:3–9.

Bahadur G, Chatterjee R, Ralph D. Testicular tissue cryopreservation in boys. Ethical and legal issues: case report. *Hum Reprod Oxf Engl* 2000;**15**:1416–1420.

Binder-Foucard F, Bossard N, Delafosse P, Belot A, Woronoff A-S, Remonet L, French network of cancer registries (Francim). Cancer incidence and mortality in France over the 1980-2012 period: solid tumors. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2014;**62**:95–108.

Bossard N, Velten M, Remonet L, Belot A, Maarouf N, Bouvier AM, Guizard AV, Tretarre B, Launoy G, Colonna M, *et al.* Survival of cancer patients in France: a population-based study from The Association of the French Cancer Registries (FRANCIM). *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2007;**43**:149–160.

Bujan L, Walschaerts M, Moinard N, Hennebicq S, Saias J, Brugnion F, Auger J, Berthaut I, Szerman E, Daudin M, *et al.* Impact of chemotherapy and radiotherapy for testicular germ cell tumors on spermatogenesis and sperm DNA: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertil Steril* 2013;**100**:673–680.

Bussen S, Sütterlin M, Steck T, Dietl J. Semen parameters in patients with unilateral testicular cancer compared to patients with other malignancies. *Arch Gynecol Obstet* 2004;**269**:196–198.

Caponecchia L, Cimino G, Sacchetto R, Fiori C, Sebastianelli A, Salacone P, Marcucci I, Tomassini S, Rago R. Do malignant diseases affect semen quality? Sperm parameters of men with cancers. *Andrologia* 2016;**48**:333–340.

Chow EJ, Stratton KL, Leisenring WM, Oeffinger KC, Sklar CA, Donaldson SS, Ginsberg JP, Kenney LB, Levine JM, Robison LL, *et al.* Pregnancy after chemotherapy in male and female survivors of childhood cancer treated between 1970 and 1999: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet Oncol* 2016;**17**:567–576.

Curaba M, Poels J, Langendonck A van, Donnez J, Wyns C. Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification? *Fertil Steril* 2011;**95**:2123.e9-12.

Daudin M, Rives N, Walschaerts M, Drouineaud V, Szerman E, Koscinski I, Eustache F, Saïas-Magnan J, Papaxanthos-Roche A, Cabry-Goubet R, *et al.* Sperm cryopreservation in adolescents and young adults with cancer: results of the French national sperm banking network (CECOS). *Fertil Steril* 2015;**103**:478–486.e1.

Desandes E, Lacour B, Belot A, White-Koning M, Velten M, Tretarre B, Sauleau E-A, Maarouf N, Guizard A-V, Delafosse P, *et al.* [Cancer incidence and survival among adolescents and young adults in France (1978-1997)]. *Bull Cancer (Paris)* 2007;**94**:331–337.

Desandes E, Lacour B, Clavel J, le Réseau français des registres de cancers. [Cancer in adolescents and young adults in France: Epidemiology and pathways of care]. *Bull Cancer (Paris)* 2016;**103**:957–965.

Dunlop CE, Brady BM, McLaughlin M, Telfer EE, White J, Cowie F, Zahra S, Wallace WHB, Anderson RA. Re-implantation of cryopreserved ovarian cortex resulting in restoration of ovarian function, natural conception and successful pregnancy after haematopoietic stem cell transplantation for Wilms tumour. *J Assist Reprod Genet* 2016;**33**:1615–1620.

Ginsberg JP, Carlson CA, Lin K, Hobbie WL, Wigo E, Wu X, Brinster RL, Kolon TF. An experimental protocol for fertility preservation in prepubertal boys recently diagnosed with cancer: a report of acceptability and safety. *Hum Reprod Oxf Engl* 2010;**25**:37–41.

Ginsberg JP, Li Y, Carlson CA, Gracia CR, Hobbie WL, Miller VA, Mulhall J, Shnorhavorian M, Brinster RL, Kolon TF. Testicular tissue cryopreservation in prepubertal male children: an analysis of parental decision-making. *Pediatr Blood Cancer* 2014;**61**:1673–1678.

Goossens E, Van Saen D, Tournaye H. Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: from research to clinic. *Hum Reprod Oxf Engl* 2013;**28**:897–907.

Green DM, Kawashima T, Stovall M, Leisenring W, Sklar CA, Mertens AC, Donaldson SS, Byrne J, Robison LL. Fertility of male survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2010;**28**:332–339.

Green DM, Liu W, Kutteh WH, Ke RW, Shelton KC, Sklar CA, Chemaitilly W, Pui C-H, Klosky JL, Spunt SL, *et al.* Cumulative alkylating agent exposure and semen parameters in adult survivors of childhood cancer: a report from the St Jude Lifetime Cohort Study. *Lancet Oncol* 2014a;**15**:1215–1223.

Green DM, Nolan VG, Goodman PJ, Whitton JA, Srivastava D, Leisenring WM, Neglia JP, Sklar CA, Kaste SC, Hudson MM, *et al.* The cyclophosphamide equivalent dose as an approach for quantifying alkylating agent exposure: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Pediatr Blood Cancer* 2014b;**61**:53–67.

Green DM, Zhu L, Wang M, Chemaitilly W, Srivastava D, Kutteh WH, Ke RW, Sklar CA, Pui C-H, Kun LE, *et al.* Effect of cranial irradiation on sperm concentration of adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the St. Jude Lifetime Cohort Study†. *Hum Reprod Oxf Engl* 2017;**32**:1192–1201.

Ho WLC, Bourne H, Gook D, Clarke G, Kemertzis M, Stern K, Agresta F, Heloury Y, Clark H, Orme L, *et al.* A short report on current fertility preservation strategies for boys. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2017; **87**:279-285.

Howell SJ, Shalet SM. Effect of cancer therapy on pituitary-testicular axis. *Int J Androl* 2002;**25**:269–276.

Howell SJ, Shalet SM. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;12–17.

- Jahnukainen K, Mitchell RT, Stukenborg J-B. Testicular function and fertility preservation after treatment for haematological cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2015;**22**:217–223.
- Keros V, Hultenby K, Borgström B, Fridström M, Jahnukainen K, Hovatta O. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Hum Reprod Oxf Engl* 2007;**22**:1384–1395.
- Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Hum Reprod Oxf Engl* 2005;**20**:1676–1687.
- Kvist K, Thorup J, Byskov AG, Høyer PE, Møllgård K, Yding Andersen C. Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Hum Reprod Oxf Engl* 2006;**21**:484–491.
- Lacour B, Goujon S, Guissou S, Guyot-Goubin A, Desmée S, Désandes E, Clavel J. Childhood cancer survival in France, 2000–2008. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP* 2014;**23**:449–457.
- Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, Bellec S, Désandes E, Clavel J. Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000–2004. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP* 2010;**19**:173–181.
- Le Guyader-Peyrou S, Belot A, Maynadié M, Binder-Foucard F, Remontet L, Troussard X, Bossard N, Monnereau A, French network of cancer registries (Francim). Cancer incidence in France over the 1980–2012 period: Hematological malignancies. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2016;**64**:103–112.
- MacKenna A, Crosby J, Huidobro C, Correa E, Duque G. Semen quality before cryopreservation and after thawing in 543 patients with testicular cancer. *JBRA Assist Reprod* 2017;**21**:31–34.
- Masliukaite I, Hagen JM, Jahnukainen K, Stukenborg J-B, Repping S, Veen F van der, Wely M van, Pelt AMM van. Establishing reference values for age-related spermatogonial quantity in prepubertal human testes: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2016;**106**:1652–1657.e2.
- Merchant TE, Conklin HM, Wu S, Lustig RH, Xiong X. Late effects of conformal radiation therapy for pediatric patients with low-grade glioma: prospective evaluation of cognitive, endocrine, and hearing deficits. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2009;**27**:3691–3697.
- Michele F de, Poels J, Weerens L, Petit C, Evrard Z, Ambroise J, Gruson D, Wyns C. Preserved seminiferous tubule integrity with spermatogonial survival and induction of Sertoli and Leydig cell maturation after long-term organotypic culture of prepubertal human testicular tissue. *Hum Reprod Oxf Engl* 2017;**32**:32–45.



Milazzo JP, Travers A, Bironneau A, Safsaf A, Gruel E, Arnoult C, Macé B, Boyer O, Rives N. Rapid screening of cryopreservation protocols for murine prepubertal testicular tissue by histology and PCNA immunostaining. *J Androl* 2010;**31**:617–630.

Milazzo JP, Vaudreuil L, Cauliez B, Gruel E, Massé L, Mousset-Siméon N, Macé B, Rives N. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. *Hum Reprod Oxf Engl* 2008;**23**:17–28.

Müller J. Impact of Cancer Therapy on the Reproductive Axis. *Horm Res Paediatr* 2003;**59**:12–20.

Nistal M, Paniagua R. Occurrence of primary spermatocytes in the infant and child testis. *Andrologia* 1984;**16**:532–536.

Nurmio M, Keros V, Lähtenmäki P, Salmi T, Kallajoki M, Jahnukainen K. Effect of childhood acute lymphoblastic leukemia therapy on spermatogonia populations and future fertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;**94**:2119–2122.

Paniagua R, Nistal M. Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty. *J Anat* 1984;**139 ( Pt 3)**:535–552.

Picton HM, Wyns C, Anderson RA, Goossens E, Jahnukainen K, Kliesch S, Mitchell RT, Pennings G, Rives N, Tournaye H, *et al.* A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys. *Hum Reprod Oxf Engl* 2015;**30**:2463–2475.

Pietzak EJ, Tasian GE, Tasian SK, Brinster RL, Carlson C, Ginsberg JP, Kolon TF. Histology of Testicular Biopsies Obtained for Experimental Fertility Preservation Protocol in Boys with Cancer. *J Urol* 2015;**194**:1420–1424.

Poels J, Van Langendonck A, Many M-C, Wese F-X, Wyns C. Vitrification preserves proliferation capacity in human spermatogonia. *Hum Reprod Oxf Engl* 2013;**28**:578–589.

Poganitsch-Korhonen M, Masliukaite I, Nurmio M, Lähtenmäki P, Wely M van, Pelt AMM van, Jahnukainen K, Stukenborg J-B. Decreased spermatogonial quantity in prepubertal boys with leukaemia treated with alkylating agents. *Leukemia* 2017;**31**:1460-1463.

Rives N, Milazzo J-P, Sibert L, Liard-Zmuda A, Travers A, Arkoun B, Perdrix A. Préservation de la fertilité masculine. *Médecine Reprod* 2012;**14**:86–93.

Rives N, Milazzo J-P, Travers A, Arkoun B, Bironneau A, Sibert L, Liard-Zmuda A, Marie-Cardine A, Schneider P, Vannier J-P, *et al.* [Cryopreservation of testicular tissue in children]. *Bull Acad Natl Med* 2013;**197**:877–886.

Sadri-Ardekani H, McLean TW, Kogan S, Sirintrapun J, Crowell K, Yousif MQ, Hodges SJ, Petty J, Pranikoff T, Sieren L, *et al.* Experimental testicular tissue banking to generate spermatogenesis in the future: A multidisciplinary team approach. *Methods San Diego Calif* 2016;**99**:120–127.

Sanders JE, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner CD, Deeg HJ, Doney K, Storb R, Sullivan K, Witherspoon R, *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.

Shalet SM, 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.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017;**67**:7–30.

Smith MA, Altekruse SF, Adamson PC, Reaman GH, Seibel NL. Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer* 2014;**120**:2497–2506.

Stukenborg J-B, Alves-Lopes JP, Kurek M, Albalushi H, Reda A, Keros V, Töhönen V, Bjarnason R, Romerius P, Sundin M, *et al.* Spermatogonial quantity in human prepubertal testicular tissue collected for fertility preservation prior to potentially sterilizing therapy. *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;**33**:1677–1683.

Talleur AC, Triplett BM, Federico S, Mamcarz E, Janssen W, Wu J, Shook D, Leung W, Furman WL. Consolidation Therapy for Newly Diagnosed Pediatric High-Risk Neuroblastoma Patients Using Busulfan/Melphalan, Autologous Hematopoietic Cell Transplant, Anti-GD2 Antibody, GM-CSF, IL-2 and Haploidentical NK Cells. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2017;**23**:1910-1917.

Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;**64**:83–103.

Wasilewski-Masker K, Seidel KD, Leisenring W, Mertens AC, Shnorhavorian M, Ritenour CW, Stovall M, Green DM, Sklar CA, Armstrong GT, *et al.* Male infertility in long-term survivors of pediatric cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Cancer Surviv Res Pract* 2014;**8**:437–447.

Wing TY, Christensen AK. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat* 1982;**165**:13–25.

Wyns C, Curaba M, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A, François-Xavier W, Donnez J. Spermatogonial survival after cryopreservation and short-term orthotopic immature human cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice. *Hum Reprod Oxf Engl* 2007;**22**:1603–1611.

Wyns C, Curaba M, Petit S, Vanabelle B, Laurent P, Wese J-FX, Donnez J. Management of fertility preservation in prepubertal patients: 5 years' experience at the Catholic University of Louvain. *Hum Reprod Oxf Engl* 2011;**26**:737–747.

Wyns C, Curaba M, Vanabelle B, Van Langendonck A, Donnez J. Options for fertility preservation in prepubertal boys. *Hum Reprod Update* 2010;**16**:312–328.

Wyns C, Van Langendonck A, Wese F-X, Donnez J, Curaba M. Long-term spermatogonial survival in cryopreserved and xenografted immature human testicular tissue. *Hum Reprod Oxf Engl* 2008;**23**:2402–2414.

## Conservation du tissu testiculaire chez le garçon pré-pubère dans le champ du cancer : Impact de la congélation et du traitement reçu sur la qualité de tissu

**Introduction.** Chez le garçon pré-pubère atteint d'un cancer, l'infertilité provoquée par les traitements a longtemps été sous-estimée. Le prélèvement chirurgical de tissu testiculaire et sa congélation constitue une des procédures possibles pour préserver leur fertilité. Cette étude a eu pour but de déterminer l'impact, d'une part, de la congélation sur la qualité structurale du tissu testiculaire après décongélation et d'autre part, des traitements du cancer reçus préalablement à la congélation sur le nombre de spermatogonies présentes dans les tubes séminifères.

**Matériels et méthodes.** La population de notre étude se composait de garçons âgés entre 1 an et 16 ans atteints d'un cancer consultant pour préservation de la fertilité avant conditionnement pour une allogreffe ou autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Une analyse histologique a été réalisée sur les biopsies testiculaires obtenues. Des marqueurs immunohistologiques ont été utilisés pour évaluer le nombre de spermatogonies (MAGE-A4) et leur capacité proliférative (PCNA). Les modifications histologiques induites par la congélation, les pathologies ou les traitements associés ont été évaluées.

**Résultats.** Au total, 91 patients ont été inclus dans l'étude. Les scores de qualité tissulaire augmentent après décongélation ( $p < 0,0001$ ), mais restent inférieurs à 1, en faveur d'une bonne préservation de l'architecture des tubes séminifères et de leur contenu. Le nombre de spermatogonies intra-tubulaires ( $p = 0,6568$ ) ainsi que le pourcentage de spermatogonies aptes à proliférer ( $p = 0,7819$ ) ne varient pas après décongélation. Nous retrouvons une diminution du nombre de spermatogonies intra-tubulaires après l'introduction d'agents alkylants (Patients avec agents alkylants 1,3 [0,3 ; 2,0] vs Patients sans agent alkylant : 2,9 [1,4 ; 6,3],  $p = 0,0353$ ).

**Conclusion.** La congélation lente contrôlée sans seeding permet une bonne conservation de l'architecture du tissu testiculaire tout en préservant le nombre de spermatogonies par tube séminifère. Les agents alkylants ont un effet néfaste systématique sur les spermatogonies. Il semblerait souhaitable de proposer, chez le garçon pré-pubère, la conservation de tissu testiculaire dès que le protocole de chimiothérapie envisagé inclut des agents alkylants avec une Cyclophosphamide Equivalent Dose  $> 4000 \text{ mg/m}^2$ .

**Mots-clés :** Préservation de la fertilité, Tissu testiculaire pré-pubère, Spermatogonie, Cancer.