

Cryoconservation du cortex ovarien chez la lapine. Toxicité des milieux de transport des ovaires

V. NETO¹, T. JOLY¹, J. LORNAGE², N. CORRAO³, S. BUFF³, P. GUÉRIN³

¹ ISARA-Lyon, 31 place Bellecour, 69288 Lyon cedex 02, France.

² Faculté de Médecine Rockefeller, Dép. de Médecine de la Reproduction, 8 av. Rockefeller 69008 Lyon, France

³ Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Laboratoire de Biologie de la Reproduction, 1 av. Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France

Résumé : La congélation du cortex ovarien permet la conservation des ressources génétiques animales par la voie femelle. Cette étude vise à définir les conditions optimales pour le transport des ovaires de lapines du prélèvement post mortem jusqu'au moment de la congélation. L'évaluation morphologique des follicules a été réalisée après un transport d'une heure dans 3 milieux (TCM 199 ; Brahma ; D-PBS) à 10°C ou à température ambiante. Nos résultats montrent qu'à 10°C le taux de follicules sans défaut morphologique est identique, quelque soit le milieu de transport. Par contre, ce taux diminue significativement lors d'un transport à température ambiante, sauf pour le TCM199. Le TCM 199 à 10°C paraît donc le plus adapté pour le transport des ovaires de lapine.

Abstract: Cryopreservation of rabbit doe ovarian cortex : toxicity of transport media. Freezing of ovarian cortex allows preservation of animal's genetic resources through the female pathway. The aim of this study was to define the optimal conditions for the transport of ovaries of the rabbit doe from the *post mortem* collection to the cryopreservation step. Morphological evaluation of follicles was made after 1 h of transport in 3 media (TCM 199, Brahma or D-PBS) at 10°C or at room temperature. Our results show that at 10°C, the proportion of follicles without any morphological defect is similar, whatever the medium is. But this rate decreases significantly during the transport at room temperature, except for TCM 199. Optimal conditions for the transport of the ovaries of the doe are TCM 199 used at 10°C.

Introduction :

La cryoconservation du cortex ovarien a été développée chez la femme dans les années 90, avec pour objectif de conserver le potentiel reproducteur des jeunes patientes devant subir un traitement gonadotoxique. Le principe de cette technique consiste à isoler la zone périphérique de l'ovaire contenant la réserve folliculaire, puis à l'incuber dans la solution cryoprotectrice avant de la congeler selon un protocole adapté au tissu ovarien. Après décongélation et retrait des cryoprotecteurs, les cortex ovariens peuvent être greffés (autogreffe ou allogreffe), cultivés *in vitro*, ou transplantés sur un individu d'une autre espèce afin d'obtenir des follicules matures capables d'être fécondés (Aubard *et al.*, 2002). Des naissances ont ainsi été obtenues après autogreffe orthotopique de cortex ovarien cryoconservé chez la brebis (Gosden *et al.*, 1994 ; Salle *et al.*, 2002) et récemment chez la femme (Donnez *et al.*, 2004).

Chez le lapin, cette technique peut initier une nouvelle approche pour la gestion des populations animales et principalement pour la conservation des ressources génétiques par la voie femelle (Neto *et al.*, 2003). Ainsi, cet outil serait complémentaire aux techniques de congélation de semence et d'embryons déjà utilisées pour sauvegarder le patrimoine génétique animal dans la cryobanquennationale (Joly *et al.*, 2003 ; Joly *et al.*, 2005) En effet, la maîtrise de la

cryoconservation des tissus ovariens permettrait une plus grande réactivité en situation d'urgence (mort accidentelle d'une lapine à haute valeur génétique, épizootie sur un cheptel précieux, races à petits effectifs ...) ou de récolte dans des situations extrêmes (animaux sauvages dans leur biotope, ...). Le prélèvement des ovaires s'effectuerait *post mortem* directement sur la femelle, quelque soit son état sexuel et à n'importe quel stade physiologique.

Afin de rendre opérationnelle cette méthode dans le cadre d'une sauvegarde d'urgence d'un patrimoine, les conditions de transport entre le prélèvement et la congélation du tissu doivent être définies précisément afin de limiter les dégradations cellulaires engendrées par l'ischémie chaude et notamment préserver au mieux la population folliculaire localisée dans la zone corticale de l'ovaire. De plus, l'ovaire de lapine nécessite une attention particulière du fait de la fragilité de l'assise folliculaire, probablement due à la faible densité en collagène et à la richesse en cellules interstitielles (Barone, 1978).

L'objectif de ce travail est de définir des conditions de transport adaptées aux ovaires de lapine par l'évaluation morphologique des follicules.

1. Matériel et Méthodes :

Les ovaires de 35 lapines, âgées de 12 à 15 semaines, ont été prélevés à l'abattoir, moins de 10 min après la mort de l'animal. Pour chaque lapine, un seul des

deux ovaires a été utilisé. Trois milieux de transport ont été comparés : le PBS modifié selon Dulbecco (IMV, France), le milieu de culture TCM 199 (Sigma, USA) et le milieu de transport de tissu ovarien Brahma (IMV, France).

Les ovaires ont été transportés pendant 1 heure, soit à 10°C en bouteille thermostatée, soit à température ambiante (environ 22°C). Au bout de ce délai, ils ont été fixés dans du paraformaldéhyde 4%, afin de permettre l'évaluation morphologique du tissu ovarien et des follicules. Cinq ovaires ont été fixés dans le paraformaldéhyde 4% immédiatement après prélèvement et constituent le témoin sans transport. Ils ont ensuite été traités pour permettre l'observation histologique. Des coupes semi-sérialisées (4 µm d'épaisseur) ont été réalisées et colorées à l'hématoxyline / phloxine.

Pour chaque ovaire, 100 follicules (primordiaux à primaires) ont été observés et classés en 4 catégories :

- follicules sans défaut de morphologie (follicule régulier, cellules folliculaires jointives, ovocyte présentant un cytoplasme plein et une chromatine diffuse et régulière) ;
- follicules avec défaut cytoplasmique (cytoplasme ovocytaire vacuolisé) ;
- follicules avec défaut nucléaire (noyau ovocytaire pycnotique ou irrégulier) ;
- follicules dégénérés (double anomalie cytoplasmique et nucléaire de l'ovocyte, forte déformation, désolidarisation entre cellules folliculaires et ovocyte, cellules folliculaires gonflées).

Seuls les follicules dont le noyau était visible ont été dénombrés.

Les résultats ont été traités par une analyse de

variance à un facteur contrôlé (test ANOVA, StatView, SAS Institute Inc). Les différences ont été considérées comme significative si $p < 0,05$.

2. Résultats :

La figure 1 montre la proportion de follicules sans défaut morphologique après 1 heure de transport dans les différentes conditions testées. Pour le lot témoin (ovaires fixés au moment de l'abattage), $85,8 \pm 2,2\%$ des follicules ne présentaient pas de défaut de morphologie. Au bout d'une heure de transport à 10°C, le taux de follicules normaux était de $89,4 \pm 3,0\%$ pour le Brahma, $92,0 \pm 2,7\%$ pour le PBS et $93,2 \pm 1,1\%$ pour le TCM 199, sans différence significative avec le témoin

Après transport à température ambiante dans le Brahma et dans le PBS, le pourcentage de follicules sans défaut chute significativement (respectivement : $32,6 \pm 6,2\%$, $p < 0,0001$ et $62,2 \pm 8,2\%$, $p = 0,001$). Par contre, à cette même température, le taux de follicules morphologiquement intacts après transport dans le TCM 199 était de $74,2 \pm 3,9\%$ et ne diffère pas significativement de celui du témoin ; cependant, il est significativement inférieur à celui observé pour un transport à 10°C dans ce même milieu.

La figure 2 indique la répartition des principales anomalies observées après transport en fonction des différentes conditions testées. La présence de vacuoles cytoplasmiques constitue le principal défaut observé (Figure 3). Elles apparaissent après transport à température ambiante, principalement pour le Brahma ($38,6 \pm 4,7\%$ des défauts observés) et pour le PBS ($35,0 \pm 8,8\%$). Les défauts nucléaires sont rares, sauf pour le Brahma à température ambiante où ils concernent $27,0 \pm 9,1\%$ des follicules morphologiquement anormaux.

Figure 1: Follicules sans défaut morphologique après 1h de transport dans les différents milieux, à 10°C et à température ambiante (Ta)

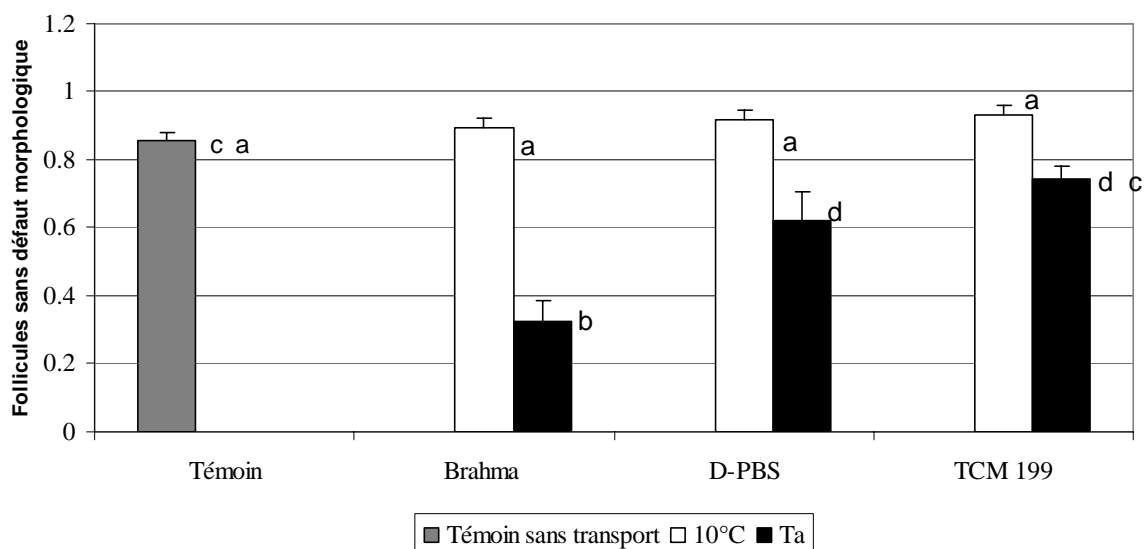


Figure 2: Répartition des différents types de défauts morphologiques induits par 1h de transport dans les différents milieux, à 10°C et à température ambiante (Ta) ; (% CY : défaut cytoplasmique ; % NX : défaut nucléaire)

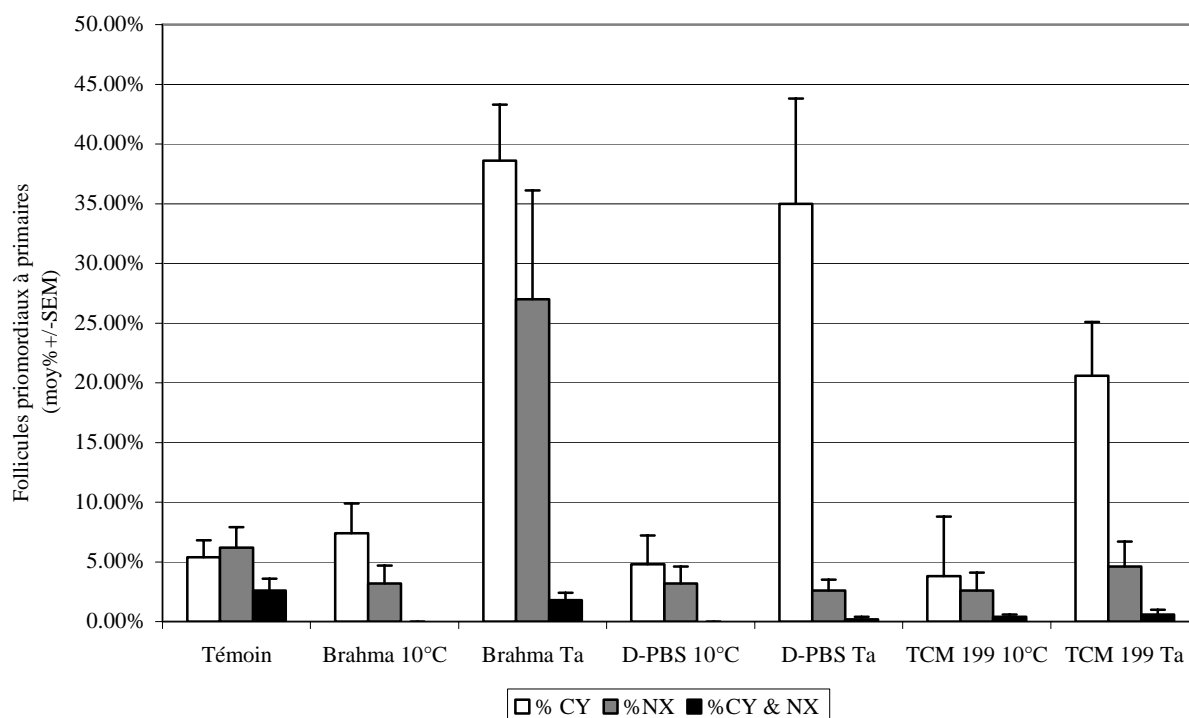
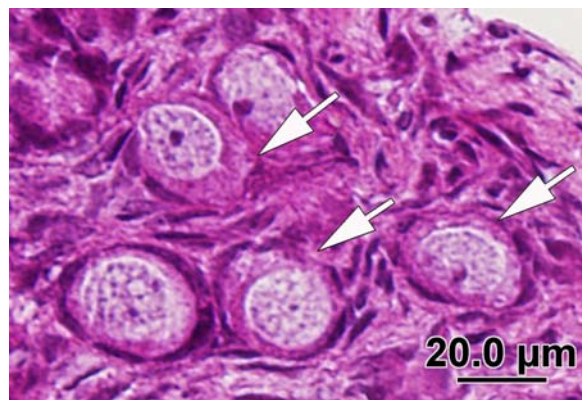
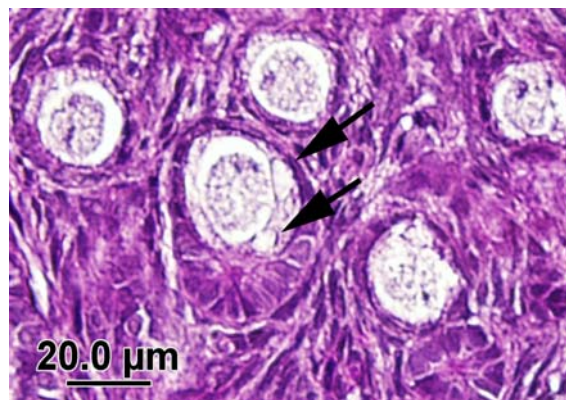


Figure 3 : Follicules primordiaux et intermédiaires de lapine transportés dans le TCM 199 à 10°C (A) et dans le Brahma à température ambiante (B). Les flèches blanches indiquent les follicules sans défaut morphologique ; les flèches noires désignent les vacuoles cytoplasmiques induites par le transport à température ambiante.

A



B



3. Discussion :

Nos travaux sur les conditions de transport des ovaires de lapines nous ont permis de choisir le milieu TCM 199 utilisé à une température idéale de 10°C. Ce milieu semble limiter convenablement les dommages liés à l'ischémie chaude suite au prélèvement *post mortem*. Il présente également les avantages d'être peu onéreux et de pouvoir maintenir une morphologie folliculaire même en cas d'élévation accidentelle de la température lors du transport. Il constitue de plus, la

base du milieu de congélation utilisé à l'étape suivante lors de la cryoconservation dans l'azote liquide du cortex ovarien isolé. Le D-PBS et le Brahma pourraient convenir pour le transport des ovaires de lapine à 10°C, mais la diminution importante du taux de follicule normaux et l'augmentation du nombre de follicules présentant des vacuoles cytoplasmiques après transport à température ambiante, est trop préjudiciable.

Peu de milieux de transport d'organe et de tissu sont proposés sur le marché et sont la plupart du temps testés chez la femme. Leur coût limite leur utilisation chez l'animal. Chez les bovins, Kim *et al* (2004) ont montré une tolérance du tissu ovarien à l'ischémie pendant 2 h dans le Leibovitz L-15, sans différence entre un transport à 0°C ou à 20°C. Chez cette même espèce, Lucci *et al* (2004), préconisent un transport à 4°C dans une solution saline ou dans du lait de coco. Ces conditions permettraient la conservation morphologique des petits follicules (moins sensibles du fait de leur faible dépendance au réseau vasculaire) jusqu'à 18 h, sans différence avec les témoins. Leurs travaux, comme les nôtres, mettent en évidence une plus grande importance de la température de transport par rapport à la nature du milieu de transport. Chez la chèvre, l'observation ultrastructurale des follicules après transport montre une meilleure résistance à 4°C, dans une solution saline (0,9%) ou une solution de Braun-Collins. Ils peuvent ainsi être conservés *in situ* pendant 12 h (Carvalho *et al.*, 2001). Les meilleurs résultats obtenus lors du stockage du tissu ovarien à basse température peuvent s'expliquer par le ralentissement de l'activité métabolique des follicules, diminuant ainsi les dégâts cellulaires engendrés par une faible oxygénation et l'absence de nutriments.

Conclusion :

Cet essai nous a permis de définir des conditions optimales pour le transport des ovaires de lapine de l'abattoir au laboratoire. Le TCM 199, utilisé à 10°C, apparaît être le plus adapté et permet de conserver 93,2±1,1% des follicules primordiaux à primaires présents dans le cortex de l'ovaire. Le tissu ovarien de lapine semble être particulièrement sensible à une température de transport trop élevée. De nouveaux essais seront nécessaires incluant notamment des tests permettant l'évaluation fonctionnelle des follicules.

Références

- AUBARD Y., POIROT C., PIVER P., 2002. [Cryopreservation of ovarian tissue]. *Gynecol Obstet Fertil*, 30, 358-366.
- BARONE R., 1978. Anatomie Comparée des Mammifères Domestiques, Tome Troisième, fascicule II. Lyon: Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.
- CARVALHO F.C.A., LUCCI C.M., SILVA J.R.V., ANDRADE E.R., BAO S.N., FIGUEIREDO J.R., 2001. Effect of Braun-Collins and Saline solution at different temperatures an incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. *Anim. Reprod. Sci.*, 66, 195-208.
- DONNEZ J., DOLMANS M.M., DEMYLLÉ D., JADOUL P., PIRARD C., SQUIFFLET J., MARTINEZ MADRID B., VAN LANGENDONCKT A., 2004. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, 364, 1405-1410.
- GOSDEN R.G., BAIRD D.T., WADE J.C., WEBB R., 1994. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Hum Reprod*, 9, 597-603.
- JOLY T., RENARD J.P., DANCHIN-BURGE C., Year. The rabbit species in the french cryobank. *9th annual conference of ESDAR*, Murcia, 1-3 september 2005.
- JOLY T., BOLET G., THEAU-CLEMENT M., FALIERES J., DE ROCHAMBEAU H., RENARD J.P., La Cryobanque Nationale : une mise en oeuvre adaptée pour l'espèce lapin. *10èmes Journées de la Recherche Cunicole*, Paris, 19 et 20 novembre, 39-42. ITAVI Ed.
- KIM S.S., YANG H.W., KANG H.G., LEE H.H., LEE H.C., KO D.S., GOSDEN R.G., 2004. Quantitative assesment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxydant (acid ascorbic) treatment. *Fertil Steril*, 82, 679-685.
- LUCCI C.M., KACINSKIS M.A., RUMPF R., BAO S.N., 2004. Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. *Theriogenology*, 61, 461-472.
- NETO V., BERTHILLOT C., EXBRAYAT J.M., JOLY T., LORNAGE J., Congélation du tissu ovarien de lapine : résultats préliminaires et observations histologiques. *10ème Journées de la Recherche Cunicole*, Paris, 19 et 20 novembre 2003.
- SALLE B., DEMIRCI B., FRANCK M., RUDIGOZ R.C., GUERIN J.F., LORNAGE J., 2002. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil Steril*, 77, 403-408.