

UNIVERSITE DE LILLE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG
Année 2024

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Phénotype andrologique des patients prélevés de pulpe
testiculaire avant un traitement gonadotoxique**

Présentée et soutenue publiquement le 14 juin 2024 à 18h00
au pôle formation

Par Eulalie MARTIN

JURY

Président :

Monsieur le Professeur François DUBOS

Asseseurs :

Madame le Docteur Bénédicte BRUNO

Madame le Docteur Laura KELLER

Monsieur le Docteur Arthur LAURIOT DIT PREVOST

Directeur de thèse :

Madame le Docteur Clara LEROY

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Sigles

| | |
|--------------|---|
| AMH | <i>Anti Mullerian Hormone</i> |
| CECOS | Centre d'Etudes et de Conservation de Œufs et du Sperme |
| CED | <i>Cyclophosphamid Equivalent Dose</i> |
| CHUL | Centre Hospitalier Universitaire de Lille |
| CLIA | Chimiluminescence |
| COL | Centre Oscar Lambret |
| CSH | Cellules souches hématopoïétiques |
| DMO | Densité Minérale Osseuse |
| DS | DéviatiOn standard |
| ELISA | <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> |
| FSH | <i>Follicular Stimulating Hormone</i> |
| ICSI | <i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i> |
| LH | <i>Luteinizing Hormone</i> |
| TESE | <i>Testicular Sperm Extraction</i> |

Sommaire

| | |
|--|----|
| Avertissement..... | 3 |
| Sigles..... | 6 |
| Sommaire | 7 |
| Introduction..... | 9 |
| 1 Contexte | 9 |
| 2 Fonctionnement testiculaire..... | 10 |
| 2.1 Les deux rôles du testicule | 10 |
| 2.2 Les facteurs gonadotoxiques..... | 11 |
| 3 Principe de cryopréservation testiculaire | 12 |
| 3.1 Les techniques de préservation de la fertilité | 12 |
| 3.2 Les méthodes de réutilisation envisagées..... | 14 |
| 4 Etat des lieux des connaissances actuelles | 15 |
| 5 Objectif | 16 |
| Article..... | 17 |
| 1 Introduction..... | 17 |
| 2 Matériel et méthodes | 18 |
| 2.1 Design de l'étude et population étudiée..... | 18 |
| 2.2 Méthode de cryopréservation | 19 |
| 2.3 Données collectées | 19 |
| 2.3.1 Au cours de la puberté..... | 20 |
| 2.3.2 En fin de puberté..... | 21 |
| 2.4 Définitions et classifications..... | 21 |
| 2.4.1 Cyclophosphamide équivalent dose | 21 |
| 2.4.2 Radiothérapie..... | 22 |
| 2.5 Analyse statistique..... | 22 |
| 2.6 Cadre réglementaire..... | 23 |
| 3 Résultats | 23 |
| 3.1 Population étudiée..... | 23 |
| 3.1.1 Flow chart | 23 |
| 3.1.2 Groupes de risque | 26 |
| 3.1.3 Suivi clinique de la population..... | 29 |
| 3.2 Profil hormonal dans l'ensemble du groupe | 29 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2.1 | Au cours de la puberté..... | 29 |
| 3.2.2 | A Tanner 5 et à l'âge adulte..... | 32 |
| 3.3 | Profil hormonal en sous populations..... | 34 |
| 3.3.1 | Selon les groupes de risque établis..... | 34 |
| 3.3.2 | Traitements reçus en pré ou péri-pubertaire..... | 35 |
| 3.3.3 | Maladie bénigne ou maladie maligne..... | 36 |
| 3.4 | Le volume testiculaire..... | 37 |
| 3.5 | Exploration de fertilité..... | 37 |
| 4 | Discussion..... | 38 |
| 4.1 | Principaux résultats et comparaison avec la littérature..... | 38 |
| 4.2 | Discussion de la méthode..... | 41 |
| 4.3 | Significativité clinique et perspective..... | 42 |
| 5 | Conclusion..... | 44 |
| | Liste des tables..... | 45 |
| | Liste des figures..... | 46 |
| | Références..... | 47 |

Introduction

1 Contexte

Dans les pays développés, la survie des enfants atteints de cancers a considérablement augmenté ces dernières années, en lien avec l'amélioration des démarches diagnostiques et des thérapeutiques. [1] On estime à plus de 80% le taux de survie à 5 ans des enfants, adolescents et jeunes adultes atteints d'un cancer. [2] De plus, de nombreuses pathologies non malignes peuvent maintenant être traitées, impliquant alors l'utilisation de traitements gonadotoxiques. [3]

Ainsi, il est accordé de plus en plus d'importance aux effets secondaires à moyen et long terme de ces traitements. Les effets secondaires d'ordre endocrinologiques sont parmi les plus fréquents, et on estime à 60% le taux d'enfants qui présenteront des séquelles gonadiques ou endocriniennes, parmi ceux ayant subi une greffe de cellule souche hématopoïétique avant l'âge de 10 ans. [4]. L'atteinte de la fertilité est considérée comme l'effet secondaire ayant le plus d'impact sur la qualité de vie des sujets devenant adultes. [5] Les troubles de la fonction testiculaire sont également un enjeu majeur pour les enfants et leurs parents. [6]

Les avancées en termes de préservation de fertilité sont majeures, et bien que son utilisation future soit encore du domaine de la recherche, une cryopréservation de tissu testiculaire (conservant alors les cellules souches germinales) peut maintenant être proposée aux enfants impubères. [7]

2 Fonctionnement testiculaire

2.1 Les deux rôles du testicule

Le fonctionnement testiculaire est séparé en deux rôles distincts : la fonction de reproduction par la fabrication des spermatozoïdes, et la fonction endocrine par la production de testostérone.

Les cellules de Sertoli sont stimulées par la FSH (*Follicular Stimulating Hormone*), elle-même sécrétée par l'hypophyse. Elles soutiennent la spermatogénèse au sein des tubes séminifères, la spermatogénèse étant le processus d'élaboration des spermatozoïdes à partir des cellules souches germinales. Les cellules de Sertoli sécrètent notamment l'inhibine B et l'hormone anti-mullérienne (AMH). Leurs dosages sont alors utiles dans l'évaluation du fonctionnement sertolien. L'élévation de la FSH peut être annonciatrice d'une altération de la spermatogénèse.

Les cellules de Leydig produisent quant à elles les androgènes testiculaires, en étant stimulées par la LH (*Luteinizing Hormone*), elle-même sécrétée par l'hypophyse. A la puberté, la production de testostérone permet l'installation et le développement des caractères sexuels secondaires. Elle a de nombreux rôles dans la vie adulte, en intervenant notamment dans la trophicité musculaire, dans le métabolisme osseux et cardiovasculaire, dans la libido et le bon fonctionnement de la fonction d'érection.

Contrairement à l'atteinte gonadique de la fille qui est souvent complète après un traitement gonadotoxique, l'atteinte chez le garçon est le plus souvent dissociée : les cellules de Sertoli sont beaucoup plus sensibles aux effets de la chimiothérapie et de la radiothérapie que les cellules de Leydig. Ainsi, après un traitement considéré à haut risque de stérilité (>80% d'azoospermie), la prévalence de l'insuffisance leydigienne est évaluée à 51%. [8]

2.2 Les facteurs gonadotoxiques

L'atteinte testiculaire va dépendre de nombreux facteurs, et notamment de la nature du traitement, de sa dose cumulative et de l'âge auquel il est reçu. Elle dépendra également de la sensibilité de chaque individu.

Les principales chimiothérapies gonadotoxiques sont les agents alkylants, dont la cytotoxicité est dose-dépendante. Du fait de leur index mitotique élevé, les spermatogonies sont très sensibles à la chimiothérapie.

Table 1. Risques estimés de dysfonction sertolienne avec les médicaments cytotoxiques [9]

| High risk | Medium risk | Low risk |
|------------------|--------------------|-----------------|
| Cyclophosphamide | Cisplatine | Vincristine |
| Ifosfamide | Carboplatine | Methotrexate |
| Chlorméthine | Doxorubicine | Dactinomycine |
| Busulfan | | Bleomycine |
| Melphalan | | Mercaptopurine |
| Procarbazine | | Vinblastine |
| Chlorambucil | | |

Les études ayant évalué l'impact des chimiothérapies sur l'enfant prépubère ont démontré l'intérêt de l'utilisation de la dose équivalente en cyclophosphamide (CED) comme un outil permettant de normaliser la dose cumulée d'exposition à différents agents alkylants. [10] Les recommandations de l'Institut National du Cancer de janvier 2021 suggèrent de proposer une conservation de tissu testiculaire à tout enfant prépubère qui va recevoir un traitement par chimiothérapie dont la CED prévisionnelle est supérieure ou égale à 5000mg/m². [11]

La radiothérapie a également un impact majeur en termes de gonadotoxicité et son risque dépend de la dose reçue sur le testicule, de son fractionnement et de l'âge lors du traitement. Ici encore, les spermatogonies sont plus sensibles que les spermatozoïdes adultes.

Les atteintes testiculaires sont présentes dès des doses très faibles d'irradiation mais sont dans ce cas en général transitoires. L'atteinte permanente survient pour des doses plus importantes. Une cryopréservation testiculaire est recommandée en cas de radiothérapie supérieure ou égale à 3 Gy sur les deux testicules, et à discuter pour les traitements exposant les testicules à des doses supérieures à 2 Gy. [11] Les cellules de Leydig sont plus résistantes, sensibles pour des doses de 20Gy chez l'enfant pré-pubère et de 30Gy chez le sujet pubère.

L'irradiation crânienne, dès 24Gy, peut également induire une dysfonction de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et ainsi des dysfonctions endocriniennes.

Enfin, la maladie elle-même de l'enfant peut avoir un impact sur le fonctionnement testiculaire : qu'il s'agisse d'une maladie maligne ou bénigne (par exemple : impact de l'hémochromatose chez les patients multi-transfusés [3]). On peut alors retrouver dans certains cas une altération de la fertilité avant même le début des thérapeutiques. [12]

3 Principe de cryopréservation testiculaire

3.1 Les techniques de préservation de la fertilité

La technique de préservation de la fertilité ne doit pas être choisie en fonction de l'âge de l'enfant, mais selon son stade pubertaire et sa maturité psychique.

Chez le garçon pubère, elle peut se faire comme chez l'adulte par conservation de spermatozoïdes. Cette technique est pratiquée depuis plus de 40 ans, et les modalités de conditionnement, de congélation et d'utilisation ultérieure des spermatozoïdes par procréation médicalement assistée sont bien maîtrisées, permettant d'obtenir des taux élevés de grossesses. [13] Chez l'adolescent, les

paramètres spermatiques recueillis sont souvent de moins bonne qualité que chez l'adulte et des techniques d'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) sont souvent nécessaires. [14]

Le recueil se fait le plus souvent par méthode non invasive par masturbation, mais peut également se faire par prélèvement chirurgical lors d'une biopsie testiculaire (en cas d'échec de recueil ou de recueil négatif).

Chez le garçon non pubère, la préservation de la fertilité passe par la cryopréservation de pulpe testiculaire afin de conserver des cellules souches spermatogoniales. En effet, le testicule est à cette période immature et ne contient pas de spermatozoïde. Le prélèvement de pulpe testiculaire est réalisé sous anesthésie générale, préférentiellement dans le même temps qu'un autre geste chirurgical. Il peut avoir lieu après le début de la chimiothérapie. [15]

On estime que chez 20% des garçons Tanner 2, la spermatogenèse a commencé et les cellules haploïdes existent. [16] Dans ces situations intermédiaires, il est possible de coupler deux techniques dans le même temps chirurgical : la préservation de pulpe testiculaire et la biopsie testiculaire à la recherche de spermatozoïdes à conserver. (Figure 1)

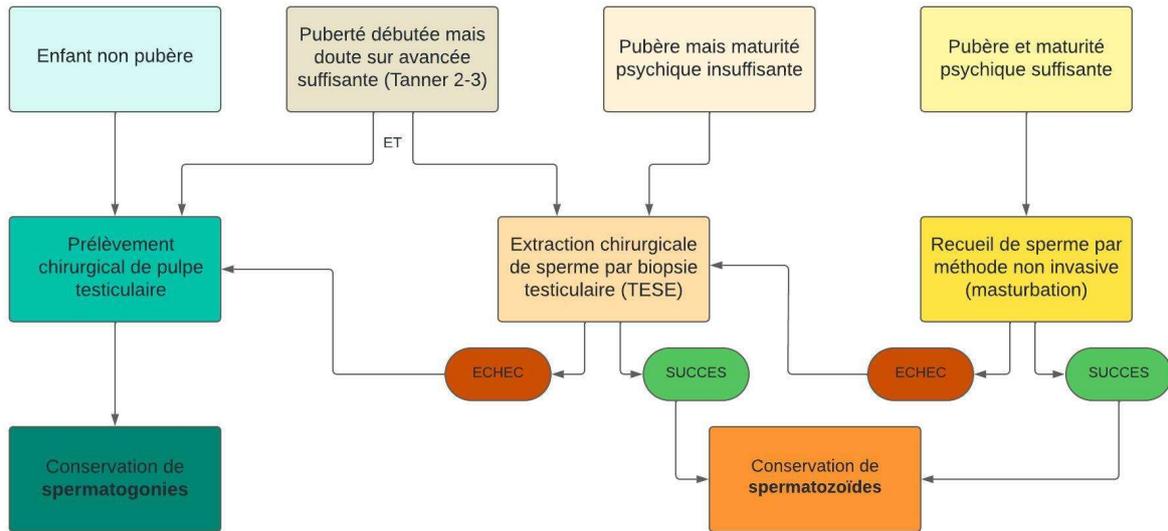


Figure 1. Choix de la technique de préservation de fertilité

3.2 Les méthodes de réutilisation envisagées

En l'état actuel des connaissances, il n'existe pas de technique mise au point permettant la réutilisation de la pulpe testiculaire prélevée dans l'enfance. Toutefois, les enfants prélevés aujourd'hui auront des projets de parentalité dans les 20 à 30 prochaines années. Il existe de nombreuses études expérimentales en cours et il est légitime d'espérer que ces techniques aboutissent à des succès dans ces délais.

Plusieurs méthodes de réutilisation des cellules souches sont envisagées. Premièrement, l'injection directe des cellules souches en suspension dans les tubes séminifères. Cela implique que les cellules souches soient capables de recoloniser les tubes séminifères afin de recréer une spermatogénèse. Ces résultats ont été obtenus dans des modèles animaux.[17] Chez l'homme, la technique fait face à plusieurs obstacles, dont le fait que les cellules souches prélevées sont trop peu nombreuses pour coloniser un testicule de volume adulte, ce qui implique leur culture préalable. [18]

Deuxièmement, la greffe de fragments de pulpe testiculaire. La survie des cellules de

Sertoli et des spermatogonies après xénogreffe de tissu humain chez la souris a été publié. [19,20] Une équipe américaine a procédé à l'autogreffe de tissu testiculaire immature sur des macaques prépubères castrés, et a réussi à obtenir une spermatogénèse efficace. Ils ont ainsi pu utiliser les spermatozoïdes par méthode ICSI, ce qui a amené à la naissance d'une femelle macaque en bonne santé (en 2018). [21]

Enfin, la dernière technique à l'étude est la maturation in vitro des spermatogonies jusqu'à l'obtention de cellules haploïdes pouvant être utilisées en ICSI. Cette technique permettrait d'isoler les spermatogonies des cellules malignes potentielles, ce qui serait intéressant surtout en cas d'hémopathie maligne. Là encore, des études sont en cours sur des modèles animaux. [22]

4 Etat des lieux des connaissances actuelles

La cryopréservation de pulpe testiculaire est un geste chirurgical réalisé depuis 2009 à Lille et depuis 2006 en France. La sûreté et l'acceptabilité de la méthode ne sont plus à prouver. Les études ont montré qu'il s'agissait d'une chirurgie peu douloureuse, avec des effets indésirables très rares. [23]

Lorsque la possibilité de cryopréservation est présentée aux enfants et à leur famille, les refus sont rares, estimés entre 10 et 23%. Un risque d'infertilité entre 25 et 30% semble une raison suffisante pour vouloir recourir au prélèvement.[25] Un tiers des familles seraient prêtes à décaler le début des chimiothérapies si cela était nécessaire pour réaliser la cryopréservation de tissu testiculaire. [24,26]

Très peu d'études se sont intéressées au suivi à long terme du fonctionnement testiculaire des enfants prélevés de pulpe testiculaire. Bien que le suivi clinico-

biologique à long terme de ces enfants ne semble pas montrer d'impact particulier du prélèvement [27], il manque d'étude s'intéressant aux profils hormonaux de ces patients.

5 Objectif

Afin de mieux comprendre et donc de mieux prendre en charge nos patients, nous nous sommes intéressés au suivi du fonctionnement testiculaire à long terme des garçons prélevés de pulpe testiculaire avant un traitement gonadotoxique.

Notre objectif principal était de décrire le profil andrologique de ces patients, tant sur le plan sertolien que sur le plan leydigien, du début de la puberté jusqu'à l'âge adulte. Nos objectifs secondaires étaient de chercher des facteurs (statut pubertaire, type de pathologie, traitements reçus) majorant les risques de dysfonction gonadique ultérieurs. Enfin, nous souhaitions comparer nos résultats avec des études portant sur des enfants n'ayant pas bénéficié de prélèvement de pulpe testiculaire, afin de confirmer la sûreté à long terme de la procédure sur la fonction gonadique.

Article

1 Introduction

Dans les pays développés, la survie des enfants atteints de cancers a considérablement augmenté ces dernières années, en lien avec l'amélioration des démarches diagnostiques et des thérapeutiques. [1] On estime à plus de 80% le taux de survie à 5 ans des enfants, adolescents et jeunes adultes atteints d'un cancer. [2] De plus, de nombreuses pathologies non malignes peuvent maintenant être traitées, impliquant alors l'utilisation de traitements gonadotoxiques. [3]

Les effets secondaires d'ordre endocrinologiques sont parmi les plus fréquents, et on estime à 60% le taux d'enfants qui présenteront des séquelles gonadiques ou endocriniennes, parmi ceux ayant subi une greffe de cellule souche hématopoïétique avant l'âge de 10ans. [4]. L'atteinte de la fertilité est considérée comme l'effet secondaire ayant le plus d'impact sur la qualité de vie des sujets devenant adultes. [5] Les troubles de la fonction testiculaire sont également un enjeu majeur pour les enfants et leurs parents. [6,25,26]

La préservation de fertilité chez les enfants impubères consiste en une cryopréservation de pulpe testiculaire, réalisée depuis de nombreuses années. La sureté et l'acceptabilité de la méthode ne sont plus à prouver. Les études ont montré qu'il s'agissait d'une chirurgie peu douloureuse, avec des effets indésirables rares. [23,24]

Très peu d'études se sont intéressées au suivi à long terme du fonctionnement testiculaire des enfants prélevés de pulpe testiculaire.

Bien que le suivi clinico-biologique à long terme des enfants prélevés du pulpe testiculaire ne semble pas montrer d'impact particulier du prélèvement [27], il manque d'étude s'intéressant aux profils hormonaux de ces patients.

Nous nous sommes intéressés au suivi du fonctionnement testiculaire à long terme des garçons prélevés de pulpe testiculaire avant un traitement gonadotoxique. Notre objectif principal était de décrire le profil andrologique de ces patients, tant sur le plan sertolien que sur le plan leydigien, du début de la puberté jusqu'à l'âge adulte. Nos objectifs secondaires étaient de chercher des facteurs (statut pubertaire, type de pathologie, traitements reçus) majorant les risques de dysfonction gonadique ultérieurs. Enfin, nous souhaitons comparer nos résultats avec des études portant sur des enfants n'ayant pas bénéficié de prélèvement de pulpe testiculaire, afin de confirmer la sûreté à long terme de la procédure sur la fonction gonadique.

2 Matériel et méthodes

2.1 Design de l'étude et population étudiée

Nous avons réalisé une étude rétrospective, observationnelle et descriptive portant sur les enfants prélevés de pulpe testiculaire avant un traitement gonadotoxique au centre hospitalier universitaire de Lille (CHUL).

Les critères d'inclusion comprenaient tous les enfants prépubères ou péri-pubertaires, prélevés de pulpe testiculaire avant un traitement gonadotoxique entre janvier 2009 et décembre 2022 et ayant plus de 9 ans actuellement (le début de puberté débutant physiologiquement entre 9 et 14 ans chez le garçon).

Les critères d'exclusions étaient les enfants décédés et les enfants âgés de moins de 9 ans. Afin d'éviter les facteurs confondants, les patients ayant un antécédent

testiculaire étaient également exclus de l'analyse : deux patients ayant subi une orchidectomie, et un patient ayant bénéficié d'une chirurgie d'abaissement testiculaire opéré tardivement à 3 ans et demi. Un patient ayant présenté une torsion testiculaire opérée n'était pas exclu de l'analyse, la chirurgie ayant eu lieu de manière précoce et n'ayant à priori pas impliqué de souffrance tissulaire notable.

2.2 Méthode de cryopréservation

La chirurgie de cryopréservation testiculaire était réalisée principalement par deux chirurgiens pédiatriques du CHUL. Le prélèvement s'effectuait de manière unilatérale, sans règle définie pour le choix du côté du prélèvement. Le testicule droit était prélevé, par habitude, dans 85% des cas. Le choix pouvait également se porter pour le testicule le plus volumineux, si une asymétrie était notée.

Le testicule était abordé par voie scrotale, après clampage manuel du cordon spermatique et incision transverse, amenant au prélèvement d'un quart à un tiers du volume testiculaire. Le testicule était ensuite remis dans l'albuginée. La technique ne nécessitait pas de geste d'hémostase. La vaginale était laissée ouverte ou fermée, selon l'opérateur réalisant le geste.

Le prélèvement était ensuite acheminé vers le laboratoire de biologie de la reproduction, où il était divisé en plusieurs fragments de 0.2 à 0.3mm en conditions stériles. Les fragments étaient ensuite congelés.

2.3 Données collectées

Pour chaque patient, nous avons recueillis au préalable les données concernant la pathologie traitée, les traitements reçus et les caractéristiques cliniques de l'enfant au moment du prélèvement.

Les données cliniques et biologiques étaient recueillies au cours du suivi des patients en endocrinologie pédiatrique puis dans le service d'andrologie. Les patients étaient en grande majorité suivis par deux praticiens hospitaliers du CHUL. Les consultations étaient pour la plupart espacées tous les six mois. Le suivi débutait en endocrinopédiatrie et se poursuivait à un âge variable en andrologie, en fonction de l'âge, de l'avancée pubertaire et de la maturité de l'adolescent.

2.3.1 Au cours de la puberté

Nous avons recueilli les taux hormonaux relatifs aux secteurs leydigiens et sertoliens, prélevés tout au long du suivi et classés en fonction du stade de Tanner correspondant à l'enfant au moment de l'analyse.

Les stades de Tanner étaient définis par les endocrinologues au cours du suivis et attribués comme tel : le stade de Tanner 1 correspondait à un dosage de LH négatif ($<0.2U/l$) ; le stade de Tanner 2 à l'obtention d'un taux positif de LH ; le stade de Tanner 5 était défini par l'arrêt de la croissance staturale. Le passage du stade de Tanner 2 à 3 et du stade 3 à 4 était défini en fonction de l'évolution du profil biologique et des signes cliniques de virilisation. Le volume testiculaire n'était pas jugé adapté à la classification, étant donné l'impact des thérapeutiques reçues sur ce dernier.

Le volume testiculaire clinique était relevé au stade de Tanner 3, ainsi que la différence de volume entre le testicule prélevé et celui non prélevé.

L'âge au début de la puberté était recherché pour les patients prélevés en pré-pubertaire. L'âge à la fin de la puberté était relevé lorsque celle-ci était achevée au moment de l'étude.

Les données biologiques étaient toutes analysées au laboratoire de biochimie du CHUL. Les dosages de LH et de testostérone totale étaient réalisés par

chimiluminescence (CLIA) sur automate Architect (Abbott Lab, USA), le dosage de l'inhibine B par méthode immuno-enzymatique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) à l'aide de la trousse Inhibine B Gen II ELISA (Beckman Coulter, France). En ce qui concerne le dosage de l'AMH, il a été réalisé jusque décembre 2015 par méthode ELISA à l'aide de la trousse EIA AMH/MIS d'Immunotech (Marseille, France) [28], puis à compter de janvier 2016 par technique CLIA à l'aide d'un automate Dxi (Beckman Coulter, France) [29].

Les normes utilisées étaient celles proposées par le laboratoire et définies selon les stades de Tanner. [30]

2.3.2 En fin de puberté

En fin de puberté, le volume testiculaire clinique ainsi que la différence de volume du testicule prélevé/ non prélevé étaient de nouveau recueillis. La mesure échographique du volume testiculaire était disponible pour certains patients.

Un relevé des données biologiques des secteurs leydigiens et sertoliens était effectué lors de la dernière évaluation réalisée en andrologie.

Enfin, chez les patients prêts et demandeurs pour réaliser un spermogramme ou une biopsie testiculaire (TESE- *Testicular Sperm Extraction*), les résultats d'exploration de fertilité étaient recensés comme échec ou succès de conservation.

2.4 Définitions et classifications

2.4.1 Cyclophosphamide equivalent dose

Afin d'estimer le potentiel toxique sur le fonctionnement testiculaire des chimiothérapies reçues, les doses cumulées d'agents alkylants étaient normalisées selon la dose reçue en équivalence de dose de cyclophosphamide (CED –

cyclophosphamide equivalent dose) calculée selon l'équation suivante : $CED (mg/m^2) = 1.0 (cumulative\ cyclophosphamide\ dose\ (mg/m^2)) + 0.244 (cumulative\ ifosfamide\ dose\ (mg/m^2)) + 0.857 (cumulative\ procarbazine\ dose\ (mg/m^2)) + 14.286 (cumulative\ chlorambucil\ dose\ (mg/m^2)) + 15.0 (cumulative\ BCNU\ dose\ (mg/m^2)) + 16.0 (cumulative\ CCNU\ dose\ (mg/m^2)) + 40 (cumulative\ melphalan\ dose\ (mg/m^2)) + 50 (cumulative\ Thio-TEPA\ dose\ (mg/m^2)) + 100 (cumulative\ nitrogen\ mustard\ dose\ (mg/m^2)) + 8.823 (cumulative\ busulfan\ dose\ (mg/m^2))$. La CED est une approche développée pour quantifier l'exposition cumulée aux différents agents alkylants. [10]

2.4.2 Radiothérapie

L'exposition à une éventuelle radiothérapie était recensée et classée comme telle : 1) pas de radiothérapie ou radiothérapie locale n'englobant pas le champ testiculaire ; 2) radiothérapie locale englobant le champ testiculaire et supérieure à 2 Gray ; 3) irradiation corporelle totale (minimum 12 Gray, en conditionnement de greffe). A noter qu'il n'y avait pas d'irradiation cérébrale ni hypophysaire chez les patients des groupes 1) et 2).

2.5 Analyse statistique

Les variables qualitatives ont été décrites en termes d'effectifs et de pourcentages. Les variables quantitatives Gaussiennes ont été décrites en termes de moyenne et d'écart-type et les variables quantitatives non Gaussiennes ont été décrites en termes de médiane et d'intervalle interquartiles.

La normalité des distributions a été vérifiée graphiquement ainsi que par l'intermédiaire du test de Shapiro-Wilk. Les comparaisons entre deux variables quantitatives

Gaussiennes ont été étudiées à l'aide d'un test de Student, ou à l'aide d'un test de Mann-Whitney pour les variables quantitatives non Gaussiennes.

Les comparaisons entre une variable qualitative à plus de deux modalités et une variable quantitative Gaussienne ont été étudiées à l'aide d'un test d'ANOVA à un facteur, ou à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis pour une variable quantitative non Gaussienne. Les comparaisons post hoc deux à deux ont été effectuées en appliquant la correction de Tukey. Les comparaisons entre une variable qualitative à plus de deux modalités et une variable qualitative ont été étudiées à l'aide d'un test du Chi-deux (ou le test exact de Fisher lorsque $N < 5$).

Le seuil de significativité pour les tests bilatéraux a été fixé à 0,05.

Les analyses ont été réalisées à l'aide de GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

2.6 Cadre réglementaire

L'étude a fait l'objet d'une déclaration auprès du de l'équipe Déléguée à la Protection des Données du GHT Lille métropole Flandre intérieure, et a été intégrée dans le registre des traitements du Centre Hospitalier Universitaire de Lille.

3 Résultats

3.1 Population étudiée

3.1.1 Flow chart

Parmi les 85 patients prélevés de pulpe testiculaire avant un traitement gonadotoxique, 50 étaient inclus dans nos analyses, comme montré dans la Figure 2. Les patients avaient un âge médian de 5,58 ans (Q1-Q3 : [4,73-12,23]) au moment du

prélèvement de pulpe testiculaire, et de 14,59 ans (Q1-Q3 : [11,13-19]) au moment de l'inclusion dans l'étude.

34% des enfants (17/50) étaient traités pour des pathologies bénignes nécessitant une greffe de cellules souches hématopoïétiques, 52% (26/50) étaient traités pour une hémopathie maligne et 14% (7/50) pour un cancer solide. Les pathologies bénignes étaient diverses : drépanocytose, déficit immunitaire, aplasie médullaire, granulomatose septique... Les hémopathies malignes étaient représentées surtout par les leucémies aiguës myéloïdes (8/26), les leucémies aiguës lymphoïdes (dont 7 de type B, 2 biphénotypiques et 2 de type T), on trouvait également des lymphomes (2 Hodgkiniens et 2 anaplasiques). Les cancers solides étaient des neuroblastomes (5/7) et des sarcomes d'Ewing (2/7).

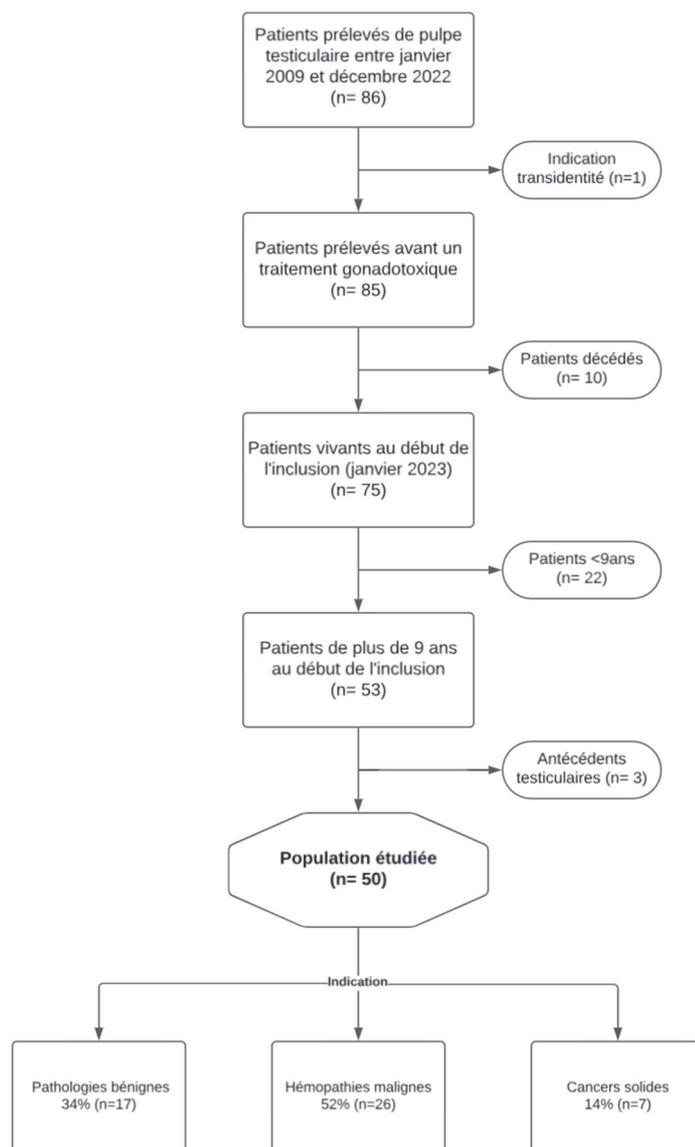


Figure 2. Flow chart.

80% des patients (40/50) recevaient une allo greffe de cellule souche hématopoïétique, 10% des enfants (5/50) bénéficiaient d'une auto-greffe, tandis que les 10% derniers (5/50) ne nécessitaient pas de greffe. Les doses d'agents alkylants reçues étaient réparties comme tel : 36% des patients (18/50) recevaient une dose inférieure à 5 000mg/m² de dose d'équivalent en cyclophosphamide, 40% des enfants (20/50) avaient une CED totale comprise entre 5 000 et 10 000 mg/m², enfin 24% des patients (12/50) recevaient une dose supérieure à 10 000 mg/m² de CED. Cette dose

comprenait à la fois les chimiothérapies potentiellement reçues en conditionnement de greffe et les chimiothérapies reçues en amont. Enfin, la majorité des sujets n'étaient pas irradiés ou recevaient une irradiation locale n'englobant pas le champ testiculaire (62% des enfants soit 31/50), alors que 10% (5/50) étaient irradiés sur une région englobant les testicules et que 28% (14/50) bénéficiaient d'une irradiation corporelle totale en conditionnement de greffe.

3.1.2 Groupes de risque

Dans l'objectif d'évaluer l'impact des chimiothérapies et de la radiothérapie sur le fonctionnement testiculaire des patients, ces derniers étaient classés en groupe de risque selon le tableau suivant (Table 2).

Table 2. Groupes de risque selon la CED et la radiothérapie reçue.

| Groupe | CED (mg/m ²) | Radiothérapie | Nombre de patients |
|--------|--------------------------|------------------|--------------------|
| 1 | <5000 | Non exposé | 9 |
| 2 | <5000 | Locale ou totale | 9 |
| 3 | 5000-10000 | Non exposé | 12 |
| 4 | 5000-10000 | Totale | 8 |
| 5 | ≥10000 | Non exposé | 9 |
| 6 | ≥10000 | Locale ou totale | 3 |

Radiothérapie locale = irradiation englobant le champ testiculaire, >2 Gy
Radiothérapie totale = irradiation corporelle totale

La Table 3 montre les caractéristiques des patients répartis dans les différents groupes de risque. On remarque que le groupe 1 ne comprend que des patients allo-greffés dans un contexte de maladie bénigne, et que les sujets traités pour un cancer solide sont répartis entre les groupes 5 et 6 uniquement. Il n'y avait pas de différence significative pour les doses de chimiothérapies reçues entre les groupes 1 et 2 ($p=0,58$) ni entre les groupes 3 et 4 ($p=0,46$).

Table 3. Description de la population selon les groupes de risque

| Groupes de risque | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| Nombre de patients | 9 | 9 | 12 | 8 | 9 | 3 |
| Age au prélèvement | 7,42 | 12,67 | 6,54 | 9,3 | 5 | 10,17 |
| Médiane (Q1-Q3) | (3,08-7,75) | (10,54-14) | (3,82-8,98) | (5,38-13,21) | (2,92-10,67) | (10,17-13,75) |
| Age au moment de l'étude | 12,42 | 14,92 | 14,84 | 17,38 | 12,42 | 12,58 |
| Médiane (Q1-Q3) | (10,8-16,09) | (13,75-19,17) | (10,79-18,69) | (11,48-21,75) | (10,05-15,21) | (12,17-21,17) |
| Type de pathologie : nb (%) | | | | | | |
| - Bénin | 9/9(100) | 1/9(11) | 5/12(42) | 1/8(12) | 1/9(11) | 0/3(0) |
| - Hémopathie maligne | 0/9(0) | 8/9(89) | 7/12(58) | 7/8(87) | 3/9(33) | 1/3(33) |
| - Cancer solide | 0/9(0) | 0/9(0) | 0/12(0) | 0/8(0) | 5/9(56) | 2/3(67) |
| Greffe : nb (%) | | | | | | |
| - Pas de greffe | 0/9(0) | 3/9(33) | 0/12(0) | 0/8(0) | 0/9(0) | 2/3(67) |
| - Allo-greffe | 9/9(100) | 6/9(67) | 12/12(100) | 8/8(100) | 4/9(44) | 1/3(33) |
| - Auto-greffe | 0/9(100) | 0/9(0) | 0/12(0) | 0/8(0) | 5/6(56) | 0/3(0) |
| CED Médiane (Q1- Q3) | 3676 (3489-4103) | 2455 (720-3154) | 8885 (7139-9235) | 6414 (5837-7014) | 13717 (10874-17503) | 20547 (10152-23770) |

Des analyses étaient également faites en fonction du statut pré ou péri-pubertaire du patient au moment des thérapeutiques reçues : 78% des enfants (39/50)

n'avaient pas encore débuté leur puberté, tant dis que 22% (11/50) étaient en cours de puberté.

3.1.3 Suivi clinique de la population

L'âge médian de rencontre avec l'endocrinologue pédiatre était de 11,9 ans (Q1-Q3 : [10 ;13,9]), et la première consultation en andrologie s'effectuait à 16,04 ans (Q1-Q3 : [14,81-18,32]). La puberté commençait à un âge médian de 12 ans (Q1-Q3 : [11,6 ;12,75]) et se terminait à 16,04 ans (Q1-Q3 : [14,81 ;18,32]). Tous les patients inclus commençaient spontanément leur puberté, et seul un patient nécessitait un traitement hormonal substitutif avant la fin de la puberté. La durée médiane de puberté était de 3,42 ans (Q1-Q3 : [3,08-3,66]). On notait que 65% des patients présentaient une gynécomastie au cours de leur puberté.

3.2 Profil hormonal dans l'ensemble du groupe

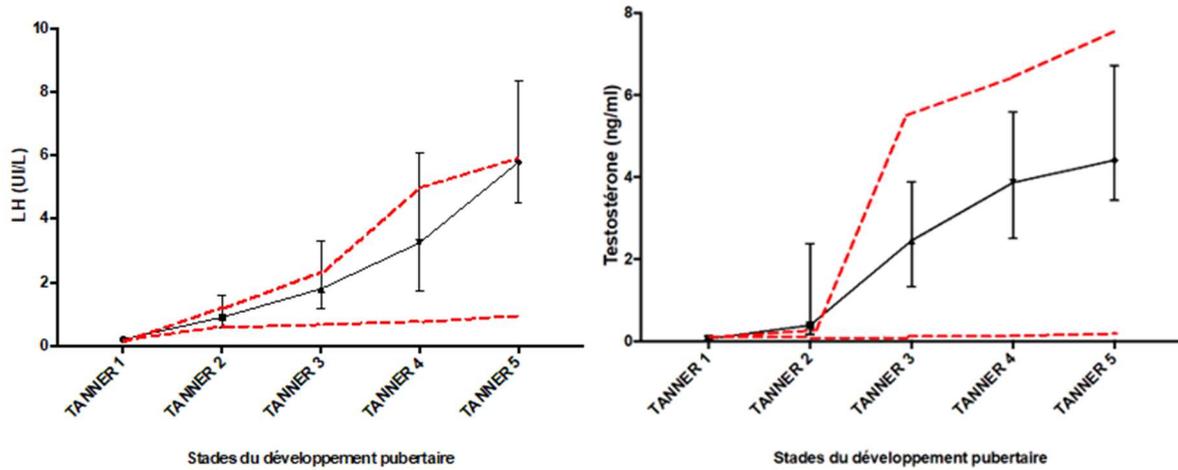
3.2.1 Au cours de la puberté

La Table 4 présente le suivi et l'évolution des marqueurs leydigien et sertoliens tout au long de la puberté.

Table 4. Suivi hormonologique au cours de la puberté, chez nos 50 patients. Médiane (Q1 ; Q3)

| | TANNER 1 | TANNER 2 | TANNER 3 | TANNER 4 | TANNER 5 |
|-----------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| LH (UI/l) | 0,2 | 0,9 (0,55-1,6) | 1,8 (1,15-3,23) | 3,25 (1,75-6,08) | 5,8 (4,5-8,35) |
| Testostérone (ng/ml) | 0,06 (0,03-0,13) | 0,39 (0,17-2,38) | 2,46 (1,33-3,89) | 3,87 (2,5-5,58) | 4,41 (3,44-6,71) |
| FSH (UI/l) | 1,5 (0,9-2,1) | 3,6 (1,85-5,86) | 6,05 (3,98-10,78) | 12,1 (8,2-15,33) | 13,4 (8,12-21,3) |
| AMH (pmol/l) | 367 (89-520) | 233 (84-354) | 62 (43-131) | 49 (32-77) | 44 (26-60) |
| Inhibine B (pg/ml) | 65,5 (42,75-70) | 111,5 (90,25-136) | 81 (69,75-159) | 38 (25-71) | 29,5 (10-75,25) |

Les marqueurs leydigiens sont représentés par la LH et la testostérone totale. Le taux de LH augmentait physiologiquement au cours de la puberté, les valeurs médianes de la population étaient toutes significativement différentes des valeurs au stade pubertaire précédant. Les valeurs de LH semblaient être de plus en plus hautes et dépasser plus souvent les normes supérieures établies dans la population générale en fin de puberté. La testostérone totale augmentait également au cours de la puberté, mais on constatait une absence de différence significative des taux prélevés aux stades de Tanner 4 et 5 ($p=0,32$).



--- normes supérieures et inférieures en population générale

Figure 3. Evolution des marqueurs leydigien au cours de la puberté, chez nos 50 patients.

Les marqueurs sertoliens sont représentés par la FSH, l'AMH et l'inhibine B. Les taux de FSH s'élevaient progressivement au cours du suivi pubertaire et semblaient devenir progressivement anormaux. Toutes les valeurs de FSH dosées à Tanner 4 et 5 dépassaient les normes supérieures proposées par le laboratoire dans la population générale à ces stades. Les valeurs d'AMH baissaient progressivement en restant dans les normes, tandis que les médianes d'inhibines B étaient inférieures aux normes attendues pour tous les stades pubertaires.

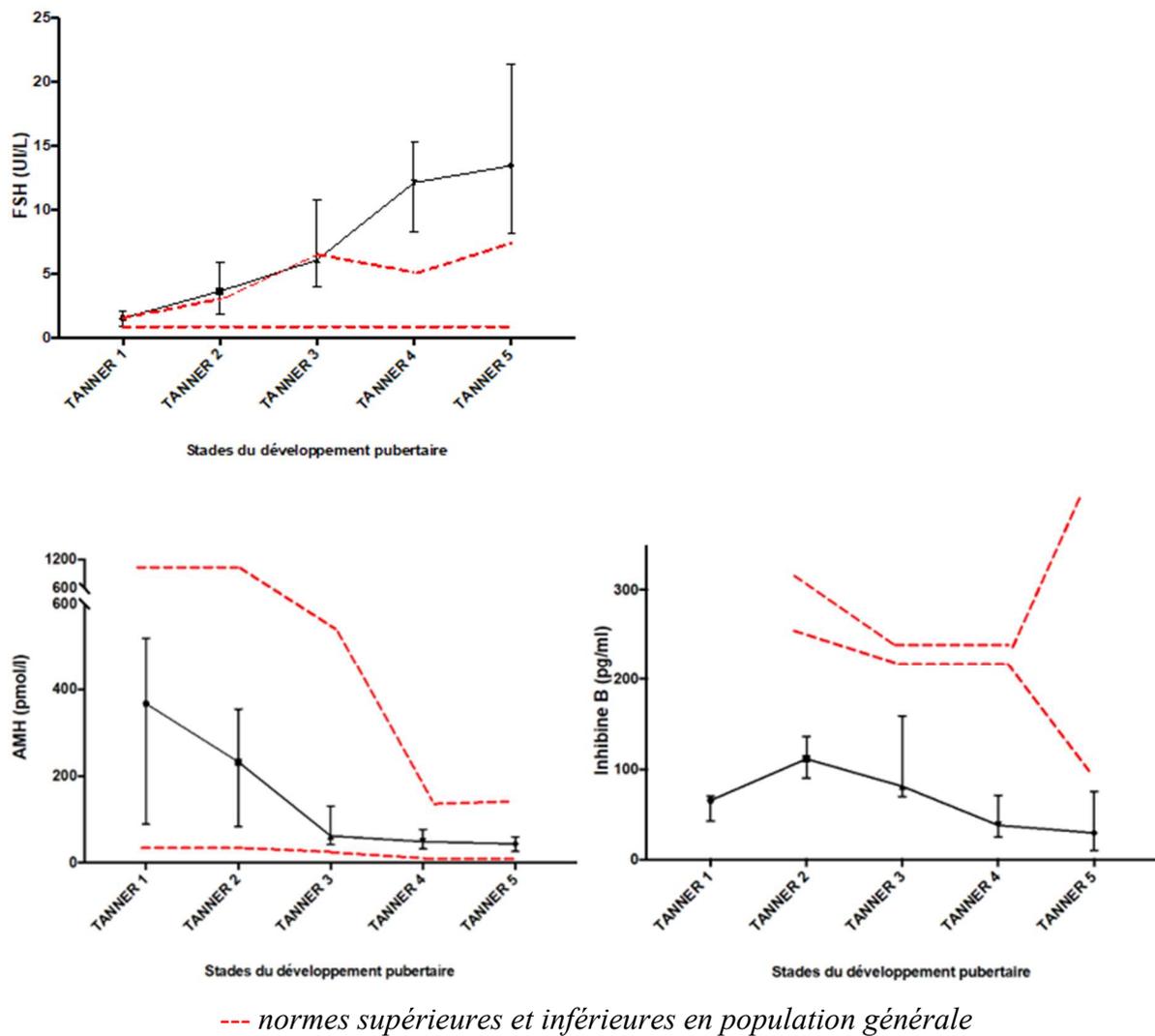


Figure 4. Evolution des marqueurs sertoliens au cours de la puberté, chez nos 50 patients.

3.2.2 A Tanner 5 et à l'âge adulte

Nous avons également comparé les données biologiques en fin de puberté à Tanner 5, et lors d'une dernière évaluation à l'âge adulte (à un âge médian de 19,21 ans). Les résultats sont retranscrits dans la Table 5.

Table 5. Comparaison des valeurs biologiques à Tanner 5 et à l'âge adulte.

| | Tanner 5 | Age adulte | P value |
|------------------------------------|-----------------------|------------------------|----------------|
| Age | 15,6 (14,95-16,25) | 19,21 (16,69-20,25) | |
| LH (UI/l) | 5,8 (4,5-8,35) | 5,85 (3,57-9,83) | 0,7769 |
| Testostérone totale (ng/ml) | 4,41 (3,44-6,71) | 3,9 (2,99-6,06) | 0,317 |
| FSH (UI/l) | 13,4 (8,17-21,3) | 14,25 (6,75-21,45) | 0,9628 |
| AMH (pmol/l) | 44 (26,4-60) | 43,25 (21,85-57) | 0,7468 |
| Inhibine B (pg/ml) | 29,5 (10-75,25) | 16 (10-65,5) | 0,451 |

Il n'y avait pas de différence significative des taux de LH, de testostérone totale, de FSH, d'inhibine B ni d'AMH entre le Tanner 5 et l'âge adulte.

En utilisant les normes attendues chez l'adulte, on retrouvait 18% des patients (3/17) qui avaient un taux de LH élevé (>10UI/l) et 12% des patients (2/18) qui avaient un dosage de testostérone inférieur au taux attendu (testostérone <2,58ng/ml), pour les patients en toute fin de puberté. A l'âge adulte, on avait également 21% des patients (3/14) qui avaient un taux de LH augmenté, et 15% des sujets (2/13) qui avaient un taux de testostérone bas.

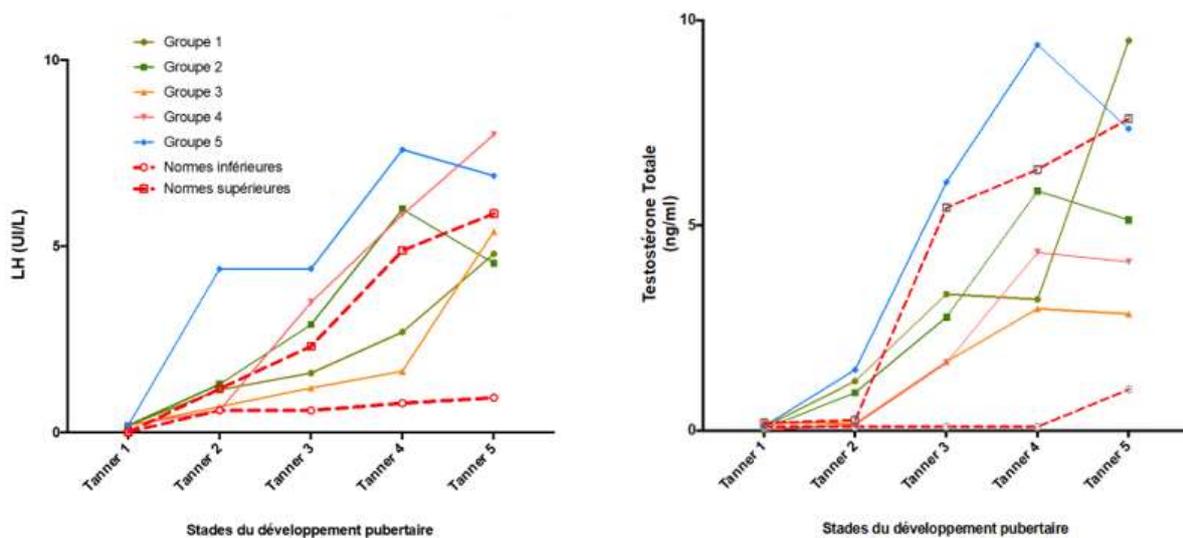
Pour le secteur sertolien, le nombre de patients présentant des taux de FSH élevés (>7,8UI/l) était important à la fois à Tanner 5 (75% soit 12/16) et lors de la dernière évaluation (71% soit 10/14), tout comme les taux d'inhibine B qui étaient en majorité très bas (<92pg/ml), chez 89% (16/18) et 93% (13/14) des patients

respectivement à Tanner 5 et à l'âge adulte. Les taux d'AMH étaient pour la plupart compris dans les normes attendues en population générale.

3.3 Profil hormonal en sous populations

3.3.1 Selon les groupes de risque établis

Les valeurs de LH étaient plus élevées tous stades confondus dans le groupe 2 par rapport au groupe 1 ($p=0,005$) ainsi que dans le groupe 4 en comparaison au groupe 3 ($p<0.0001$), groupes qui recevaient des doses similaires de chimiothérapie mais qui différaient par le fait d'avoir reçu ou non de la radiothérapie. On ne retrouvait pas de tendance superposable concernant les taux de testostérone.

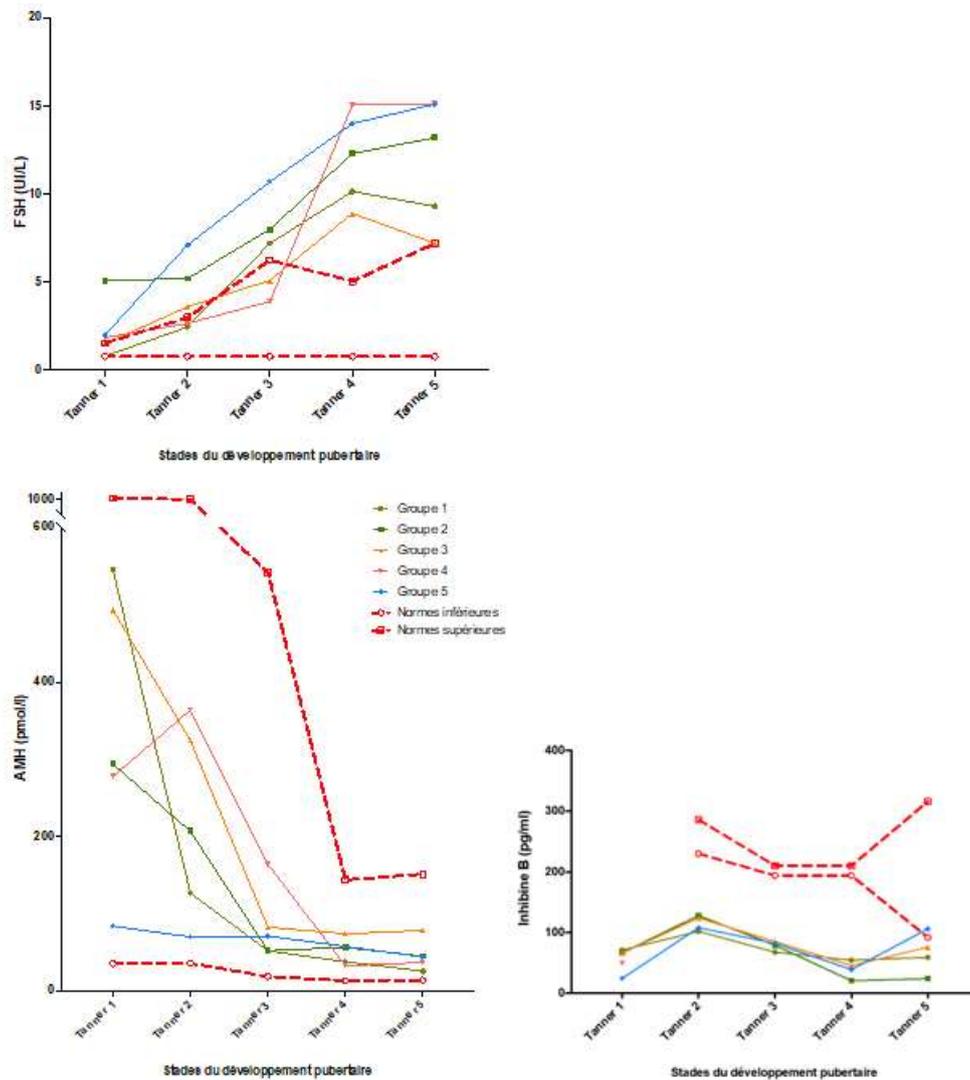


--- normes supérieures et inférieures en population générale

Figure 5. Evolution des marqueurs leydigien au cours de la puberté, selon les groupes de risque.

Comme constaté pour les taux de LH, les taux de FSH étaient significativement plus élevés tout au long de la puberté dans le groupe 2 par rapport au groupe 1 ($p=0,01$) et dans le groupe 4 comparé au groupe 3 ($p=0.02$). Concernant l'AMH et

l'inhibine B, les taux n'étaient pas plus bas dans les groupes ayant reçu de la radiothérapie, par rapport à ceux n'en ayant pas reçu, à CED équivalentes.



--- normes supérieures et inférieures en population générale

Figure 6. Evolution des marqueurs sertoliens au cours de la puberté, selon les groupes de risque.

3.3.2 Traitements reçus en pré ou péri-pubertaire

Nous avons comparé les taux hormonaux en cours de puberté selon si les sujets avaient reçu une intensification de traitement en pré pubertaire ou en péri-

pubertaire. Les analyses à chaque stade de Tanner ne retrouvaient pas de différences significatives.

On constatait tout de même des taux de FSH plus élevés à Tanner 5 chez les patients traités en péri-pubertaire, avec une analyse proche de la différence significative ($p=0.0556$).

3.3.3 Maladie bénigne ou maladie maligne

Nous avons comparé les valeurs biologiques à Tanner 5 des enfants traités pour une pathologie bénigne, par rapport aux enfants traités pour une pathologie maligne (hémopathie ou cancer solide), indépendamment des doses de chimiothérapie ou radiothérapies reçues. Les valeurs retrouvées pour le secteur leydigien étaient assez proches dans les deux groupes. Cependant pour le secteur sertolien, les taux de FSH étaient plus élevés chez les sujets traités pour une pathologie maligne ($p=0,035$) et les taux d'inhibine B étaient plus bas ($p=0,0091$). On ne retrouvait pas de différence dans les taux d'AMH.

Table 6. Comparaison des valeurs biologique à Tanner 5 selon le type de pathologie traitée.

| | Pathologie bénigne | Pathologie maligne | P-value |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| LH (UI/l) | 4,8 (3,8-6,45) | 6,1 (5,02-12,53) | 0,1946 |
| Testostérone totale (ng/ml) | 7,35 (3,09-10,45) | 4,41 (3,69-5,81) | 0,3758 |
| FSH (UI/l) | 8,5 (6,05-12,15) | 13,7 (11,1-27,3) | 0,035 |
| AMH (pmol/l) | 44 (23,7-60) | 44,5 (27,25-72,05) | 0,8169 |
| Inhibine B (pg/ml) | 76 (53-94,5) | 19 (10-35,5) | 0,0091 |

3.4 Le volume testiculaire

L'évaluation clinique du volume testiculaire ne retrouvait pas de différence de volume significative entre le testicule ayant vécu le prélèvement de pulpe testiculaire et le testicule sain. On note que le volume testiculaire évoluait peu entre le Tanner 3 et le Tanner 5. Le volume médian à Tanner 3 était de 4,75ml (3-6,25) du côté de la chirurgie et 5,5ml (4-7) du côté non prélevé, contre des médianes respectivement à 6ml (5-7) et 7ml (5-12) au stade de Tanner 5.

Les données de mesure échographique de volume testiculaire en fin de puberté n'étaient pas suffisamment nombreuses pour être analysées.

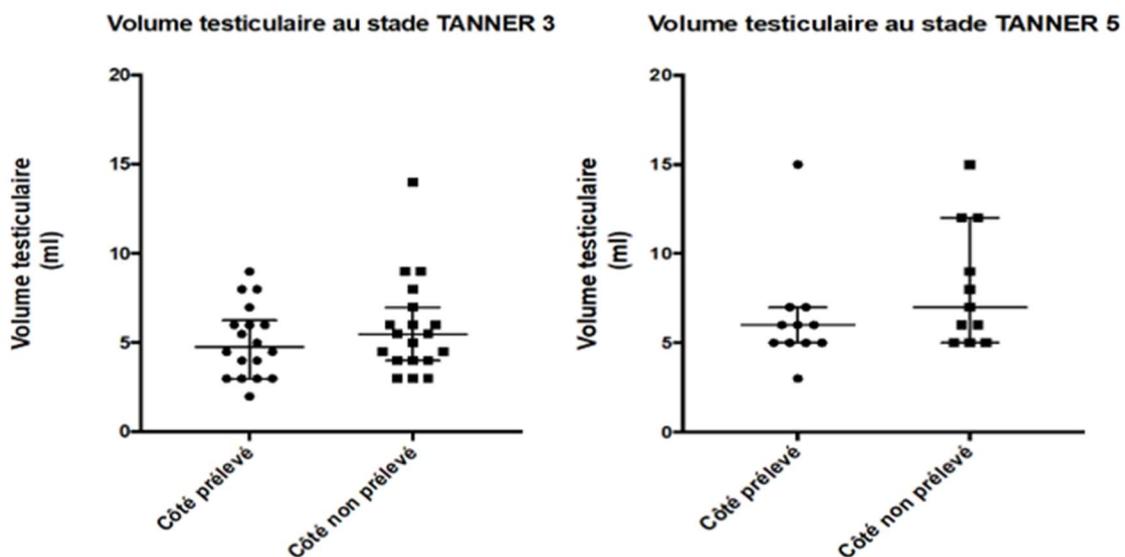


Figure 7. Volumes testiculaires à Tanner 3 et 5.

3.5 Exploration de fertilité

Chez les sujets à qui était proposée une exploration de fertilité, 33% des patients (5/15) ne souhaitaient pas la réaliser. Parmi les 10 ayant réalisé une ou

plusieurs tentatives de préservation de fertilité, 40% des patients (4/10) pouvaient conserver des spermatozoïdes tandis que 60% (6/10) avaient un spermogramme retrouvant une azoospermie.

4 Discussion

4.1 Principaux résultats et comparaison avec la littérature

De nombreuses études ont travaillé sur les traitements gonadotoxiques chez les enfants, et l'impact des chimiothérapies et de la radiothérapie à long terme sur les fonctions de reproduction sont déjà bien connus. On sait également que chez le garçon, le secteur sertolien est bien plus fragile que le secteur leydigien. Toutefois, peu d'études se sont consacrées à caractériser la fonction hormonale, et les risques d'atteintes de la production de testostérone sont peu décrits.

Parmi les études s'intéressant aux effets secondaires endocriniens post traitement gonadotoxiques, la plupart s'intéressent spécifiquement aux enfants greffés de CSH, et certaines soit aux enfants greffés pour une pathologie bénigne, soit aux enfants greffés pour une pathologie maligne. Les études discutant des enfants traités pour des cancers solides ou mélangeant tous les types de pathologies sont plus rares. Nombre de ces études n'évoquent pas la réalisation ou non d'une technique de préservation de fertilité.

Nous avons suivi 50 enfants entre 2009 et 2023, afin d'analyser leurs profils cliniques et biologiques tout au long de la puberté et jusqu'à l'âge adulte.

Même si tous les sujets progressaient spontanément dans leur puberté (hormis un patient qui recevait un traitement substitutif avant l'âge adulte), les analyses

mettaient déjà en évidence au cours de la puberté un certain degré d'insuffisance gonadique, avec des taux de LH élevés.

Les résultats biologiques du secteur leydigien ne semblaient pas différer si les enfants étaient traités pour une pathologie bénigne ou maligne, ni s'ils avaient été traités en péri-pubertaire plutôt qu'en pré-pubertaire.

Dans la littérature, la majorité des sujets de cohortes d'enfants greffés débutent et accomplissent spontanément leur puberté, tout comme observé dans notre population.

[31] Une étude suédoise centrée sur le suivi de garçons prélevés de pulpe testiculaire avant greffe de CSH retrouvait 21% de garçons présentant un taux de LH anormalement élevé à la fin du suivi, nous avons retrouvé précisément le même taux.

L'âge et le statut pubertaire ne semblait pas avoir d'impact sur l'apparition de la dysfonction testiculaire. [27] Chez une population de patients greffés pour des pathologies bénignes (non prélevés de pulpe), 32% des patients présentaient une dysfonction gonadique à distance des traitements, avec un effet protecteur chez les patients traités en pré-pubertaire comparativement à ceux traités en péri pubertaires.

[3]

Le profil évolutif du secteur sertolien retrouvait également une altération déjà présente en début de puberté et semblant s'accroître avant la fin de celle-ci, avec des taux d'inhibine B toujours inférieurs aux normes et des taux de FSH de plus en plus élevés, notés dès le stade de Tanner 3.

Dans notre cohorte, les patients traités pour des pathologies malignes avaient des marqueurs sertoliens significativement plus altérés que ceux traités pour des pathologies bénignes. De même, les patients traités en péri-pubertaire avaient des

taux de FSH plus élevés et des valeurs d'inhibine B plus basses que ceux traités en pré-pubertaire, même si notre population était probablement trop réduite pour amener à une différence significative.

Une étude belge s'est spécifiquement intéressée aux fonctions reproductives à distance d'un traitement gonadotoxique chez des enfants prélevés de pulpe testiculaire (biopsie <5% du volume testiculaire), et cherchait à confirmer la sûreté à long terme de la procédure sur la fonction gonadique. Ils retrouvaient des données (FSH et spermogrammes) similaires aux publications portant sur des enfants n'ayant pas eu de prélèvement chirurgical. [32] Nous avons trouvé des résultats équivalents concernant les analyses de spermogrammes en fin de puberté (60% d'azoospermie contre 50 à 72% dans des populations greffées pour des pathologies bénignes ou ayant reçu des agents alkylants dans un cadre oncologique). [22,33]

En revanche, nous constatons dans notre population un pourcentage plus élevé de patients ayant des taux anormaux de FSH (71% à l'âge adulte dans notre population, 33% de patients avec FSH>10 UI/l dans l'étude Belge précédemment citée, 56,2% de patients avec FSH >15UI/l dans une population de patients greffés de CSH pour tout type d'indication avant 18 ans). [34] Ces résultats sont difficiles à comparer étant donné que les normes de FSH choisies par le promoteur diffèrent d'une étude à l'autre. En effet, nous aurions trouvé 43% de patients avec un taux de FSH >15UI/l et 64% de nos patients avaient un taux de FSH >10UI/l.

Même si le pourcentage de patients ayant déjà des anomalies biologiques en fin de puberté était élevé, ce taux ne semblait pas augmenter dans les quelques années suivantes. Une étude italienne publiée en 2023, qui ne discutait pas des éventuelles modalités de préservation de fertilité, a montré la tendance à la diminution

des androgènes dans les 20 à 30 ans suivant la greffe de cellule souche hématopoïétique chez des garçons de moins de 18 ans. Nous n'avions pas assez de recul pour observer ces résultats. De plus, cette étude trouvait un risque moins important de dysfonctionnement gonadique chez les enfants greffés en pré-pubertaire, en comparaison à ceux pris en charge en péri ou post pubertaire. [34]

Enfin, nous n'avons pas trouvé de modification importante de volume entre le testicule prélevé de pulpe testiculaire et le testicule non prélevé. Une étude récente a réalisé des échographies testiculaires répétées chez 64 garçons prélevés de pulpe testiculaire de manière unilatérale, et ne retrouvait pas de différence de volume à 12 mois de la chirurgie. [35]. Nous n'avions que très peu de valeurs de volume testiculaire échographique, et notre analyse se basait donc sur une évaluation clinique. Nous étions également bien plus à distance de la chirurgie que dans cette étude.

4.2 Discussion de la méthode

Un des points forts de notre étude est avant tout le nombre de patients inclus et la durée du suivi réalisé au décours des traitements reçus. Le CHUL a réalisé 86 prélèvements de pulpe testiculaire entre 2009 et fin 2022, et 26% des patients (13/50) avaient plus de 18 ans au moment de l'étude.

Malgré cela, une part importante des sujets étaient encore jeunes au moment de l'inclusion dans l'étude, empêchant l'analyse complète ou partielle de leurs données. Cela a entraîné une perte de puissance dans nos analyses. Les prélèvements de pulpe ayant débuté en 2009 à Lille, il était par conséquent impossible d'avoir davantage de

recul, et il faudra attendre plusieurs années afin de pouvoir récolter plus de données sur le suivi de ces patients.

Une part de subjectivité et de variabilité inter-opérateur peut avoir altéré les estimations cliniques des volumes testiculaires. Toutefois, nos patients n'étaient suivis que par deux praticiens différents, ce qui limite ce biais.

Le nombre de patients ayant eu des dosages de testostérone libre, testostérone biodisponible, de SBP et de testostérone/ SBP était trop faible et leurs résultats n'ont donc pas été analysés. Leurs analyses permettraient une meilleure interprétation des profils biologiques.

4.3 Significativité clinique et perspective

Les pratiques en termes de préservation de fertilité et plus particulièrement en termes de chirurgie de cryopréservation testiculaire sont extrêmement variables d'un centre à l'autre.

Premièrement, les recommandations ne proposent pas toutes les mêmes indications à la préservation de pulpe testiculaire, que ce soit à travers les différents pays européens ou dans le reste du monde. [36,37]

Deuxièmement, les techniques chirurgicales ne sont pas les mêmes. En effet, aucune étude n'a comparé les différentes méthodes chirurgicales possibles. [22] Alors que certains centres réalisent des biopsies de moins de 5% du volume testiculaire, d'autres proposent des biopsies ne dépassant pas 50% du volume testiculaire. [32,35] Si la plupart des centres proposent des prélèvements unilatéraux, d'autres préfèrent réaliser des prélèvements bilatéraux, ou laissent ce choix à l'appréciation du praticien. [27]

Ces deux points vont obligatoirement rendre plus difficile et moins systématique l'extrapolation de nos résultats à d'autres centres.

Toutefois, cette étude nous permet de mieux comprendre le profil évolutif de nos patients, et nous aidera à mieux les suivre et mieux les prendre en charge, tout au long de leur puberté, mais aussi à l'âge adulte.

Lors des premières consultations de suivi en andrologie, les possibilités d'exploration de fertilité sont souvent abordées. L'inquiétude sur le vieillissement prématuré du testicule nous amène à discuter d'une exploration de fertilité à des adolescents ou adultes jeunes, qui parfois refusent ou préfèrent différer le projet. Notre étude, qui ne montre pas de différence entre les profils hormonaux des sujets à Tanner 5 et ceux des jeunes adultes, nous conforte dans l'idée qu'il faut accompagner les patients dans leur cheminement sans les presser. Nous avons cependant peu de recul, et ne pouvons donc pas prévoir l'évolution du fonctionnement testiculaire plus à distance de la fin de la puberté, notamment dans les 5 à 10 années suivantes.

De même, le secteur leydigien semble pouvoir être altéré dès le début du suivi en andrologie, mais cette insuffisance testiculaire ne s'aggrave pas dans les 3-4 années suivantes. Ces données nous aident à décider du moment opportun pour instaurer un traitement hormonal substitutif.

Afin d'augmenter la puissance de notre étude, il faudra poursuivre la récolte de nos données et reconduire les analyses lorsque la cohorte deviendra plus importante. Il serait également intéressant de comparer nos résultats à une population n'ayant pas vécu le prélèvement de pulpe testiculaire. En gardant les mêmes critères d'inclusion et d'exclusion, nous comptons 21 patients ayant reçu une allo-greffe de CSH et rentrant dans les indications de prélèvement de pulpe testiculaire, chez qui le prélèvement n'avait pas été effectué du fait d'une contre-indication médicale (manque

de temps, risque infectieux) ou par refus de la famille. Cette population pourrait en théorie être comparée à nos 40 enfants prélevés avant une allo-greffe, mais les effectifs seraient trop faibles pour obtenir des résultats interprétables, et les groupes ne seraient de plus pas comparables en termes de traitements reçus. Cette analyse comparative deviendra probablement possible dans les prochaines années.

5 Conclusion

Cette étude nous confirme l'importance du suivi précoce et prolongé de notre population. Elle nous oriente dans l'organisation du suivi du patient, ainsi que dans le timing des explorations et des traitements à proposer.

La poursuite de l'étude permettra d'augmenter sa pertinence et sa puissance.

Liste des tables

| | |
|--|----|
| Table 1. Risques estimés de dysfonction sertolienne avec les médicaments cytotoxiques [9]..... | 11 |
| Table 2. Groupes de risque selon la CED et la radiothérapie reçue..... | 26 |
| Table 3. Description de la population selon les groupes de risque..... | 28 |
| Table 4. Suivi hormonologique au cours de la puberté, chez nos 50 patients. Médiane (Q1 ; Q3)..... | 30 |
| Table 5. Comparaison des valeurs biologiques à Tanner 5 et à l'âge adulte..... | 33 |
| Table 6. Comparaison des valeurs biologique à Tanner 5 selon le type de pathologie traitée..... | 36 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Choix de la technique de préservation de fertilité | 14 |
| Figure 2. Flow chart. | 25 |
| Figure 3. Evolution des marqueurs leydigien au cours de la puberté, chez nos 50 patients. | 31 |
| Figure 4. Evolution des marqueurs sertoliens au cours de la puberté, chez nos 50 patients. | 32 |
| Figure 5. Evolution des marqueurs leydigien au cours de la puberté, selon les groupes de risque. | 34 |
| Figure 6. Evolution des marqueurs sertoliens au cours de la puberté, selon les groupes de risque. | 35 |
| Figure 7. Volumes testiculaires à Tanner 3 et 5. | 37 |

Références

- [1] Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang X-S, et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet* 2015;385:977–1010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62038-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62038-9).
- [2] Bonaventure A, Harewood R, Stiller CA, Gatta G, Clavel J, Stefan DC, et al. Worldwide comparison of survival from childhood leukaemia for 1995–2009, by subtype, age, and sex (CONCORD-2): a population-based study of individual data for 89 828 children from 198 registries in 53 countries. *Lancet Haematol* 2017;4:e202–17. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(17\)30052-2](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30052-2).
- [3] de Kloet LC, Bense JE, van der Stoep MYEC, Louwerens M, von Asmuth EGJ, Lankester AC, et al. Late endocrine effects after hematopoietic stem cell transplantation in children with nonmalignant diseases. *Bone Marrow Transplant* 2022;57:1564–72. <https://doi.org/10.1038/s41409-022-01755-x>.
- [4] Hows JM, Passweg JR, Tichelli A, Locasciulli A, Szydlo R, Bacigalupo A, et al. Comparison of long-term outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from matched sibling and unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 2006;38:799–805. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705531>.
- [5] Zebrack BJ, Casillas J, Nohr L, Adams H, Zeltzer LK. Fertility issues for young adult survivors of childhood cancer. *Psychooncology* 2004;13:689–99. <https://doi.org/10.1002/pon.784>.
- [6] Taylor JF, Ott MA. Fertility Preservation after a Cancer Diagnosis: A Systematic Review of Adolescents', Parents', and Providers' Perspectives, Experiences, and Preferences. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2016;29:585–98. <https://doi.org/10.1016/j.jpag.2016.04.005>.
- [7] Rives N, Milazzo J-P, Travers A, Arkoun B, Bironneau A, Sibert L, et al. [Cryopreservation of testicular tissue in children]. *Bull Acad Natl Med* 2013;197:877–86; discussion 886.
- [8] Lopez R, Plat G, Bertrand Y, Ducassou S, Saultier P, Berbis J, et al. Testosterone deficiency in men surviving childhood acute leukemia after treatment with hematopoietic stem cell transplantation or testicular radiation: an L.E.A. study. *Bone Marrow Transplant* 2021;56:1422–5. <https://doi.org/10.1038/s41409-020-01180-y>.
- [9] Wallace WHB, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol* 2005;6:209–18. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70092-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70092-9).
- [10] Green DM, Nolan VG, Goodman PJ, Whitton JA, Srivastava D, Leisenring WM, 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* 2014;61:53–67. <https://doi.org/10.1002/pbc.24679>.
- [11] Rives N, Courbière B, Almont T, Kassab D, Berger C, Grynberg M, et al. What should be done in terms of fertility preservation for patients with cancer? The French 2021 guidelines. *Eur J Cancer* 2022.
- [12] Levine J, Canada A, Stern CJ. Fertility preservation in adolescents and young adults with cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2010;28:4831–41. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.8312>.
- [13] Ginsberg JP. Educational paper: The effect of cancer therapy on fertility, the assessment of fertility and fertility preservation options for pediatric patients. *Eur J Pediatr* 2011;170:703–8. <https://doi.org/10.1007/s00431-010-1359-4>.
- [14] Wallace WHB. Oncofertility and preservation of reproductive capacity in children and young adults. *Cancer* 2011;117:2301–10. <https://doi.org/10.1002/cncr.26045>.
- [15] de Lambert G, Poirot C, Guérin F, Brugières L, Martelli H. La préservation de la fertilité dans les cancers de l'enfant. *Bull Cancer (Paris)* 2015;102:436–42. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2015.02.015>.
- [16] Wyns C, Curaba M, Vanabelle B, Van Langendonckt A, Donnez J. Options for fertility preservation in prepubertal boys. *Hum Reprod Update* 2010;16:312–28. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp054>.
- [17] Schlatt S, Kim S, Gosden R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. *Reproduction* 2002;124:339–46. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1240339>.
- [18] Struijk RB, Mulder CL, Van Der Veen F, Van Pelt AMM, Repping S. Restoring Fertility in Sterile Childhood Cancer Survivors by Autotransplanting Spermatogonial Stem Cells: Are We There Yet? *BioMed Res Int* 2013;2013:1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/903142>.
- [19] Geens M, De Block G, Goossens E, Frederickx V, Van Steirteghem A, Tournaye H. Spermatogonial survival after grafting human testicular tissue to immunodeficient mice. *Hum Reprod* 2006;21:390–6. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei412>.
- [20] Goossens E, Geens M, De Block G, Tournaye H. Spermatogonial survival in long-term human prepubertal xenografts. *Fertil Steril* 2008;90:2019–22. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.044>.
- [21] Fayomi AP, Peters K, Sukhwani M, Valli-Pulaski H, Shetty G, Meistrich ML, et al. Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. *Science* 2019;363:1314–9. <https://doi.org/10.1126/science.aav2914>.
- [22] Wyns C, Kanbar M, Giudice MG, Poels J. Fertility preservation for prepubertal boys: lessons learned from the past and update on remaining challenges towards clinical translation. *Hum Reprod Update* 2021;27:433–59. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa050>.

- [23] Delgouffe E, Braye A, Goossens E. Testicular Tissue Banking for Fertility Preservation in Young Boys: Which Patients Should Be Included? *Front Endocrinol* 2022;13:854186. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.854186>.
- [24] Moussaoui D, Surbone A, Adam C, Diesch-Furlanetto T, Girardin C, Bénard J, et al. Testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys: A 6 year experience from a Swiss multi-center network. *Front Pediatr* 2022;10:909000. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.909000>.
- [25] Gupta AA, Donen RM, Sung L, Boydell KM, Lo KC, Stephens D, et al. Testicular Biopsy for Fertility Preservation in Prepubertal Boys with Cancer: Identifying Preferences for Procedure and Reactions to Disclosure Practices. *J Urol* 2016;196:219–24. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.02.2967>.
- [26] Ginsberg JP, Li Y, Carlson CA, Gracia CR, Hobbie WL, Miller VA, et al. Testicular tissue cryopreservation in prepubertal male children: an analysis of parental decision-making. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61:1673–8. <https://doi.org/10.1002/pbc.25078>.
- [27] Borgström B, Fridström M, Gustafsson B, Ljungman P, Rodriguez-Wallberg KA. A prospective study on the long-term outcome of prepubertal and pubertal boys undergoing testicular biopsy for fertility preservation prior to hematologic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2020;67:e28507. <https://doi.org/10.1002/pbc.28507>.
- [28] Aksglaede L, Sørensen K, Boas M, Mouritsen A, Hagen CP, Jensen RB, et al. Changes in Anti-Müllerian Hormone (AMH) throughout the Life Span: A Population-Based Study of 1027 Healthy Males from Birth (Cord Blood) to the Age of 69 Years. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:5357–64. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1207>.
- [29] Demirdjian G, Bord S, Lejeune C, Masica R, Rivière D, Nicouleau L, et al. Performance characteristics of the Access AMH assay for the quantitative determination of anti-Müllerian hormone (AMH) levels on the Access* family of automated immunoassay systems. *Clin Biochem* 2016;49:1267–73. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.08.005>.
- [30] Konforte D, Shea JL, Kyriakopoulou L, Colantonio D, Cohen AH, Shaw J, et al. Complex Biological Pattern of Fertility Hormones in Children and Adolescents: A Study of Healthy Children from the CALIPER Cohort and Establishment of Pediatric Reference Intervals. *Clin Chem* 2013;59:1215–27. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.204123>.
- [31] Cohen A, Békássy AN, Gaiero A, Faraci M, Zecca S, Tichelli A, et al. Endocrinological late complications after hematopoietic SCT in children. *Bone Marrow Transplant* 2008;41 Suppl 2:S43-48. <https://doi.org/10.1038/bmt.2008.54>.
- [32] Kanbar M, de Michele F, Giudice MG, Desmet L, Poels J, Wyns C. Long-term follow-up of boys who have undergone a testicular biopsy for fertility preservation. *Hum Reprod Oxf Engl* 2021;36:26–39. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa281>.
- [33] Green DM, Liu W, Kutteh WH, Ke RW, Shelton KC, Sklar CA, 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* 2014;15:1215–23. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70408-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70408-5).
- [34] Cattoni A, Nicolosi ML, Capitoli G, Gadda A, Molinari S, Louka S, et al. Pubertal attainment and Leydig cell function following pediatric hematopoietic stem cell transplantation: a three-decade longitudinal assessment. *Front Endocrinol* 2023;14:1292683. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1292683>.
- [35] Uijldert M, Meißner A, de Melker AA, van Pelt AMM, van de Wetering MD, van Rijn RR, et al. Development of the testis in pre-pubertal boys with cancer after biopsy for fertility preservation. *Hum Reprod Oxf Engl* 2017;32:2366–72. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex306>.
- [36] Picton HM, Wyns C, Anderson RA, Goossens E, Jahnukainen K, Kliesch S, et al. A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys. *Hum Reprod* 2015;30:2463–75. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev190>.
- [37] Font-Gonzalez A, Mulder RL, Loeffen EAH, Byrne J, Van Dulmen-den Broeder E, Van Den Heuvel-Eibrink MM, et al. Fertility preservation in children, adolescents, and young adults with cancer: Quality of clinical practice guidelines and variations in recommendations. *Cancer* 2016;122:2216–23. <https://doi.org/10.1002/cncr.30047>.

AUTEURE : Nom : MARTIN **Prénom :** Eulalie

Date de Soutenance : 14/06/2024

Titre de la Thèse : Phénotype andrologique des enfants prélevés de pulpe testiculaire avant un traitement gonadotoxique.

Thèse - Médecine - Lille 2024

Cadre de classement : Pédiatrie

DES + FST ou option : Pédiatrie, Endocrinopédiatrie

Mots-clés : cryopréservation, pulpe testiculaire, fertilité, traitement gonadotoxique, andrologie

Résumé :

Contexte : La survie des enfants atteints de cancers a considérablement augmenté ces dernières années. L'atteinte de la fertilité fait partie des effets secondaires ayant le plus d'impact sur la qualité de vie des sujets devant adultes. La cryopréservation de pulpe testiculaire chez les garçons impubères est proposée avant un traitement gonadotoxique depuis de nombreuses années. Peu d'études se sont intéressées au suivi du fonctionnement testiculaire à long terme de ces patients. Notre objectif était de décrire le profil andrologique de ces patients, sur le plan sertolien et leydigien, du début de la puberté jusqu'à l'âge adulte. Nous cherchions également à établir des facteurs majorant le risque d'altération testiculaire, et à confirmer la sûreté à long terme de la cryopréservation testiculaire sur le fonctionnement gonadique.

Matériel et Méthodes : Tous les enfants prélevés de pulpe testiculaire au CHUL entre 2009 et 2022, vivants et ayant plus de 9ans, sans antécédents testiculaires, étaient inclus rétrospectivement. Leurs profils pubertaires cliniques et biologiques étaient recensés à chaque stade de Tanner ainsi qu'à l'âge adulte.

Résultats : 50 enfants étaient inclus dans l'étude. Ils bénéficiaient de traitements gonadotoxiques pour des pathologies bénignes ou malignes. 80% recevaient une allo greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Tous les patients débutaient spontanément leur puberté. Les signes d'altération sertolienne et leydigienne étaient déjà présents pendant la puberté et augmentaient progressivement. En fin de puberté, 18% des patients avaient un taux de LH élevé, 75% un taux de FSH augmenté et 89% un taux d'inhibine B anormalement bas. La radiothérapie entraînait une augmentation des gonadotrophines à doses de chimiothérapies équivalentes. Le secteur sertolien était plus altéré chez les enfants traités pour des pathologies malignes, et chez ceux traités en péri-pubertaire. On ne retrouvait pas de différence de volume testiculaire entre le testicule prélevé et celui non prélevé.

Conclusion : Cette étude nous permet de mieux comprendre le devenir du fonctionnement testiculaire de nos patients, et ainsi de mieux les prendre en charge. Nos résultats sont comparables à ceux décrits dans la littérature chez des enfants n'ayant pas vécu la cryopréservation testiculaire et semblent confirmer la sûreté de la méthode sur le fonctionnement gonadique. La poursuite de cette étude permettra d'augmenter sa puissance.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur François Dubos

Asseseurs : Madame le Docteur Laura Keller

Madame le Docteur Bénédicte Bruno

Monsieur le Docteur Arthur Lauriot Dit Prévost

Directeur : Madame le Docteur Clara Leroy