

*COLLÈGE NATIONAL
DES GYNÉCOLOGUES ET OBSTÉTRICIENS FRANÇAIS
Président : Professeur B. Hédon*

Quatrième partie
Préservation de la fertilité



*38^{es} JOURNÉES NATIONALES
Paris, 2014*

Techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) pour préserver la fertilité féminine en cas de cancer

B. COURBIERE ^{1, 2}, M. GRYNBERG ^{3, 4, 5}
(Marseille, Bondy, Bobigny, Paris)

Résumé

La préservation des gamètes en vue d'une utilisation future en assistance médicale à la procréation (AMP) doit s'inscrire dans le parcours personnalisé de soins des enfants et des femmes jeunes en âge de procréer dès qu'un traitement gonadotoxique est envisagé. La technique de cryoconservation des gamètes ou de tissu germinale - conditionnée par l'âge de la patiente et sa réserve ovarienne - doit être discutée de façon multidisciplinaire en tenant compte du type de cancer, de l'urgence du traitement anticancéreux et des doses cumulées de drogues ovariotoxiques. La vitrification d'ovocytes matures, recueillis après

- 1 - Hôpital de la Conception - Pôle de gynécologie-obstétrique et reproduction - Gynepole - AP-HM - 147 boulevard Baille - 13385 Marseille cedex 05
- 2 - Aix-Marseille Université - CNRS - IRD - Avignon Université - IMBE UMR 7263 - 13397 Marseille
- 3 - Hôpital Jean Verdier - Service de médecine de la reproduction - Avenue du 14 juillet - 93140 Bondy
- 4 - Université Paris XIII - 74 rue Marcel Cachin - 93000 Bobigny
- 5 - Unité Inserm U1133 - Université Paris-Diderot - 5 rue Thomas Mann - 75013 Paris

stimulation ovarienne et ponction folliculaire, est une technique recommandée lorsqu'il est possible d'avoir un délai pour stimuler d'au moins deux semaines avant le début de la chimiothérapie et qu'une hyperœstrogénie transitoire n'est pas contre-indiquée. La vitrification ovocytaire peut théoriquement être proposée à toutes les femmes à partir du moment où elles sont réglées. Les indications de FIV en urgence pour congélation embryonnaire sont maintenant largement supplantées par les indications de vitrification ovocytaire. Cependant, une congélation embryonnaire peut être discutée lorsque la patiente est en couple avec un projet parental préexistant à l'annonce du cancer. La cryoconservation de tissu ovarien est une stratégie à envisager en cas de traitement jugé à haut risque d'insuffisance ovarienne prématurée, quand la chimiothérapie doit être débutée sans délai et/ou quand une stimulation ovarienne est contre-indiquée. C'est aussi la seule technique possible chez l'enfant avant la puberté, qui permet de congeler les follicules de réserves du cortex ovarien, dans le but de regreffer des fragments de cortex pour restaurer fonctions endocrine et exocrine. L'autogreffe ovarienne, encore jugée expérimentale par la législation française, a comme principale limite le risque théorique de réintroduction de cellules malignes, en particulier dans les hémopathies malignes. La maturation ovocytaire in vitro (MIV) consiste en un recueil d'ovocytes au stade de vésicule germinative à partir des follicules antraux, puis à leur mise en culture en vue d'obtenir des ovocytes matures. La MIV, que peu de centres proposent en France, et que beaucoup jugent expérimentale dans le cadre de la préservation de la fertilité, constitue une stratégie intéressante pour les femmes atteintes de pathologie hormono-dépendante telle que le cancer du sein, ou en cas de maladie faisant contre-indiquer une future greffe de cortex ovarien congelé.

Mots clés : cancer, fertilité, vitrification, ovocyte

Déclaration publique d'intérêt

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt en relation avec le sujet traité.

INTRODUCTION

La toxicité gonadique des traitements anticancéreux est longtemps passée au second plan devant la gravité du pronostic des cancers. Ce n'est qu'avec l'amélioration de la survie des patientes et le souci croissant de la qualité de vie après cancer que s'est posée la question de leur fertilité ultérieure [1]. Depuis la dernière révision de la loi de bioéthique en 2004 et son décret d'application en 2006, la législation française prévoit que « (...) toute personne peut bénéficier du recueil et de la conservation de ses gamètes ou de tissu germinale (...), lorsqu'une prise en charge médicale est susceptible d'altérer sa fertilité (...) ». Le plan cancer 2009-2013 prévoyait la reconnaissance « de plateformes régionales de cryobiologie (...) pour améliorer l'accès à la préservation de la fertilité des personnes atteintes de cancer (action 21.3). Le troisième plan cancer (2014-2019) vient de mettre en avant la nécessité de préserver la continuité et la qualité de vie après cancer, et un de ses objectifs est d'assurer l'accès des patients à la préservation de la fertilité.

Les indications de préservation des gamètes sont nombreuses et comportent en particulier les traitements les plus gonadotoxiques comme les chimiothérapies à forte dose d'alkylants, les traitements myéloablatifs avant greffe de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques ou une radiothérapie abdomino-pelvienne à forte dose [2]. Chez l'homme, la conservation de spermatozoïdes avant le début d'une chimiothérapie fait partie de la pratique médicale courante.

Chez la femme, les particularités de la physiologie ovarienne rendent plus difficile l'autoconservation des gamètes. Dans l'ovaire coexistent des follicules à différents stades de croissance [3]. La folliculogénèse permettant la formation d'un follicule pré-ovulatoire depuis la réserve de follicules primordiaux dure environ 6 mois ; et tous les mois, seul un follicule mature est produit en vue de l'ovulation d'un ovocyte mature. De plus, l'ovocyte mature, qui est la plus grosse cellule de l'organisme humain, est une cellule comportant beaucoup d'eau [4]. L'ovocyte mature est très cryosensible. En cryobiologie, les méthodes classiques de congélation entraînent la formation de cristaux de glace pouvant entraîner des lésions cellulaires, potentiellement délétères sur le fuseau méiotique de l'ovocyte mature [5].

D'autre part, la possibilité de préserver des gamètes chez la femme est sous-tendue par la nécessité d'une réserve ovarienne sous-jacente suffisante. Le capital folliculaire ovarien est constitué d'une réserve de cellules germinales formée avant la naissance pour la totalité de la vie

reproductive : cette réserve chute progressivement dès le troisième trimestre de vie fœtale par des phénomènes d'atrésie et d'ovulation jusqu'à la ménopause [6]. À la naissance, il existe environ un million de follicules de réserves et 400 000 au début de la puberté. Au cours de la vie génitale d'une femme, moins de 500 follicules se développeront jusqu'à l'ovulation. D'après les modèles mathématiques les plus récents, la diminution de la réserve ovarienne folliculaire est constante et régulière avec l'âge [7] : à 30 et 40 ans, il ne resterait respectivement dans les ovaires plus que 12 % et 3 % des follicules formés avant la naissance. C'est pourquoi la réserve ovarienne va conditionner les possibilités de préservation des ovocytes. L'âge de la patiente et la réserve ovarienne folliculaire sont des facteurs limitants pour la préservation de la fertilité féminine ; beaucoup d'équipes s'accordant pour un âge limite de 35 ans, avec parfois des cas de préservation jusqu'à 40 ans.

La technique de cryoconservation des gamètes ou de tissu germinale doit être discutée de façon multidisciplinaire en tenant compte de l'urgence du traitement anticancéreux et des doses cumulées de drogues ovariotoxiques, de l'âge de la patiente et de sa réserve ovarienne [8]. Elle doit également tenir compte de la durée des traitements adjuvants complémentaires, comme l'hormonothérapie dans les cancers du sein et du délai estimé par l'oncologue avant l'autorisation d'une grossesse.

I. CRYOCONSERVATION D'OVOCYTES MATURES PAR VITRIFICATION

La vitrification est un procédé qui permet - grâce à l'utilisation de cryoprotecteurs à haute concentration et à des vitesses de refroidissement rapide - de piéger toutes les solutions aqueuses dans un état solide appelé état vitreux qui ne contient pas de cristal de glace délétère pour les cellules [9]. Depuis la première naissance publiée en 1999 [10], la vitrification des ovocytes matures a révolutionné la biologie de la reproduction en raison des excellents taux de survie ovocytaire après réchauffement, avec des taux de grossesse identiques à l'utilisation d'ovocytes « frais » [11]. Depuis, l'obtention de nombreuses naissances dans le monde ont rassuré sur l'innocuité de cette technique et la vitrification ovocytaire a été autorisée en France en Juillet 2011 [12]. Sur le plan international, la vitrification ovocytaire

n'est plus désormais considérée comme une technique expérimentale et est recommandée comme technique de première intention pour la préservation de la fertilité féminine [8, 13].

I.1. Indications

La vitrification d'ovocytes matures, recueillis après stimulation ovarienne et ponction folliculaire, peut théoriquement être proposée à toutes les femmes à partir du moment où elles sont réglées. Chez les jeunes filles mineures et vierges, la réalisation d'une ponction par voie vaginale est discutée au cas par cas avec la jeune fille et ses parents en fonction de sa maturité et de ses convictions religieuses.

La vitrification ovocytaire est non mutilante pour l'ovaire, et permet ainsi de proposer une préservation de la fertilité à des patientes dont les risques d'insuffisance ovarienne prématurée, quoique non systématiques, sont mal quantifiables et/ou partiels [15]. Par exemple, la chimiothérapie des patientes atteintes d'un cancer du sein n'est pas systématiquement pourvoyeuse d'insuffisance ovarienne prématurée et ne représente pas à ce titre une indication optimale de cryoconservation de tissu ovarien [16]. Cette technique peut aussi être proposée en cas de maladie de Hodgkin, même en cas de chimiothérapie peu gonadotoxique type ABVD [14] ; dans l'éventualité d'une rechute et d'une escalade thérapeutique.

La stimulation ovarienne impose d'avoir un délai minimal de deux semaines pour stimuler les ovaires avec un recueil des ovocytes matures par ponction des follicules réalisée par voie vaginale. En cas de désir de grossesse et autorisation pour une grossesse par les oncologues, les ovocytes vitrifiés pourront être réchauffés, mis en fécondation avec les spermatozoïdes du conjoint et les embryons pourront être transférés après une préparation endométriale par traitement hormonal substitutif. La large expérience des pays pratiquant depuis de nombreuses années la vitrification ovocytaire nous laisse espérer des chances élevées de grossesse dans le domaine de l'oncofertilité [15].

I.2. Limites de la technique

La vitrification ovocytaire n'est possible que pour les femmes ayant une réserve ovarienne suffisante pour espérer répondre de façon suffisante à la stimulation ovarienne. Il peut arriver, souvent après

35 ans, mais parfois avant, qu'une diminution de la réserve ovarienne soit diagnostiquée au moment de la consultation d'oncofertilité, empêchant ainsi de proposer une stimulation ovarienne.

Le recueil ovocytaire peut être décevant, même en cas de réserve ovarienne normale, comme cela a été mis en évidence dans les lymphomes [16]. Malgré l'absence de lignes de chimiothérapie antérieures, les femmes atteintes de cancer sembleraient avoir une réponse plus faible à la stimulation ovarienne ; mais cette notion de diminution de la réponse ovarienne chez les femmes atteintes de cancer reste débattue [15]. Les auteurs avancent comme hypothèse à cette diminution de la réponse ovarienne un état catabolique propre à ce type de pathologie, avec malnutrition, perte de poids et risque de dysfonction hypothalamique, associé à un état de stress qui serait l'origine d'une diminution de la fertilité [17].

La proposition d'une vitrification ovocytaire en urgence nécessite de pouvoir disposer de deux et idéalement de trois semaines, le temps de stimuler et de ponctionner, en ajoutant à cela un certain temps de réflexion à la patiente [16]. La réalisation d'une stimulation ovarienne après un ou deux cycles de chimiothérapie a montré une mauvaise réponse ovarienne à la stimulation par les gonadotrophines, probablement par conséquence d'une diminution de la réserve ovarienne et d'une destruction des follicules antraux. Dans certaines pathologies, et en particulier dans les leucémies aiguës, la chimiothérapie doit être débattue en urgence et ne permet pas d'envisager chez les femmes une stimulation ovarienne avant le début de la chimiothérapie d'induction. Les patientes atteintes de leucémie sont en général vues en consultation d'oncofertilité après les cures d'induction et de consolidation, quand leur état de santé s'est amélioré, et avant l'instauration de chimiothérapies plus gonadotoxiques si une greffe de moelle est programmée. Suite à une expérience clinique chez seulement deux patientes, Rossi *et al.* ont estimé que la toxicité des cures d'induction par daunorubicine et cytarabine était faible et préconisaient de stimuler dans une intercure pour congeler des embryons avant greffe de moelle [18]. Il a cependant été montré dans des cultures de tissu ovarien exposés *in vitro* à de la daunorubicine des lésions double-brins de l'ADN ovocytaire [19]. Après exposition de souris au cyclophosphamide, Meirow *et al.* avaient observé sur des portées issues des follicules exposés à la chimiothérapie en pré-ovulatoire un taux élevé d'avortement spontané précoce (56 %) [20]. Le taux de malformation congénitale des portées était dix fois supérieur par rapport au groupe témoin (1,2 %). Les taux les plus élevés de malformations (33 %) étaient observés en cas de conceptions issues d'ovocytes exposées au

cyclophosphamide lors des stades précoces de la croissance folliculaire. Ce n'est que plusieurs semaines après la fin de l'exposition et après plusieurs cycles de folliculogénèse que le taux de malformations congénitales redevenait similaire à celui du groupe témoin. Du fait de ces données expérimentales, Meiorow *et al.* conseillaient de ne pas réaliser de stimulation ovarienne dans les suites immédiates d'une chimiothérapie. Ainsi, en cas de proposition d'une stimulation ovarienne en vue d'une vitrification ovocytaire après une première ligne de chimiothérapie, il faut bien informer la patiente qu'il n'existe actuellement aucune information concernant les risques mutagènes ovocytaires. Les études de cohortes des enfants nés de mères aux antécédents de traitement anticancéreux sont rassurantes et ne montrent pas d'augmentation du risque d'anomalies chromosomiques, ni d'anomalies congénitales [21, 22]. Cependant, ces enfants ont été en général conçus à distance d'une chimiothérapie et nous pouvons supposer qu'ils sont issus d'ovocytes qui étaient dans des follicules primordiaux au moment de la chimiothérapie.

La stimulation ovarienne a pour conséquence une hyperœstrognie, et entraîne parfois des réserves de la part des soignants en cas de tumeurs hormonosensibles comme le cancer du sein [13]. Cependant, de plus en plus d'auteurs réalisent maintenant une stimulation ovarienne pour préservation de la fertilité dans le cadre du cancer du sein [23], après la chirurgie, et avant le début de la chimiothérapie. Il est préconisé de limiter le taux d'œstrogènes circulants, notamment par le biais d'une stimulation ovarienne par tamoxifène ou létrozole, ces derniers n'ayant cependant pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France pour l'induction de l'ovulation [24].

En France, l'AMP est prise en charge chez les femmes jusqu'au jour de leurs 43 ans. La réutilisation des gamètes dans le cadre du cancer ne fait pas l'objet de dérogation de la part de la sécurité sociale. Il faut donc tenir compte des délais nécessaires entre la prise en charge du cancer et la future autorisation pour une grossesse. Par exemple, en cas de cancer du sein hormonodépendant, les protocoles habituels recommandent 5 ans d'hormonothérapie adjuvante avant d'envisager une grossesse, donnant une limite supérieure d'âge de 38 ans pour la préservation des ovocytes des cancers du sein hormonosensibles.

1.3. Chances de grossesse

Plus d'un millier d'enfants sont nés dans le monde après vitrification ovocytaire dans un contexte hors oncofertilité [12, 25]. Stoop *et al.* ont montré que la probabilité de grossesse après stimulation ovarienne et FIV était corrélée à l'âge et au nombre d'ovocytes matures recueillis ; avec une moyenne de 22,53 +/- 1,55 ovocytes matures pour obtenir une naissance vivante entre 23 et 37 ans, cette moyenne atteignant 55,5 +/- 34 ovocytes matures par naissance chez les femmes de plus de 38 ans. Cette étude estimait comme raisonnable de fixer un seuil de 37 ans comme limite d'âge supérieure pour la préservation de la fertilité [26]. Avant 37 ans, chaque ovocyte mature donne une chance de naissance de 4,47 %. L'étude de Rienzi *et al.* a estimé qu'avant 38 ans, la vitrification de 8 ovocytes matures permettrait un taux de naissance vivante de 46,4 % [11].

La vitrification ovocytaire est une technique encore récente dans le domaine de l'oncofertilité avec très peu de données à long terme concernant les chances de grossesse dans ce contexte. La plus grosse série actuellement publiée est celle de Garcia-Velasco *et al.* qui a colligé 340 patientes ayant bénéficié d'une stimulation ovarienne pour vitrification ovocytaire dans le cadre du cancer, avec une moyenne de 8,5 +/- 6,4 ovocytes matures vitrifiés [27]. Cette étude ne rapporte que quatre patientes qui ont demandé une utilisation de leurs ovocytes avec obtention d'une naissance et d'un avortement spontané précoce à 6 SA.

L'information donnée actuellement aux patientes atteintes d'un cancer quant à leurs chances de grossesse en cas de vitrification d'ovocytes matures s'inspire des excellents résultats issus des programmes de don d'ovocytes européens avec des donneuses jeunes en bonne santé [28]. Nous ne disposons pas de données à long terme sur les chances de grossesse après vitrification d'ovocytes de femmes plus âgées avec une pathologie cancéreuse, chez qui est notée une diminution du nombre d'ovocytes recueillis par rapport à une population infertile témoin.

Étant donné le faible « rendement » d'un cycle de stimulation ovarienne chez les patientes atteintes de cancer, avec en général un délai avant la chimiothérapie ne permettant pas de réaliser un deuxième cycle de stimulation, certaines équipes préconisent d'associer des techniques complémentaires de préservation des ovocytes, la stratégie maximaliste consistant en une cryoconservation de tissu ovarien avant le cycle de stimulation ovarienne. Cette dernière stratégie permet de conserver des ovocytes à tous les stades de croissance

folliculaire, mais demande du temps pour l'organisation d'une coelioscopie puis d'une stimulation ovarienne dans ses suites.

II. CRYOCONSERVATION EMBRYONNAIRE

Avant l'autorisation de la vitrification en France, la congélation embryonnaire après « FIV en urgence » a été une stratégie proposée par de nombreuses équipes pour préserver la fertilité [29]. Les indications de congélation embryonnaire après FIV sont maintenant largement supplantées par les indications de vitrification ovocytaire. La congélation n'est pas au sens strict une technique de préservation de la fertilité féminine, car elle concerne le couple. C'est cependant une technique prévue par la législation française : « la congélation peut aussi être proposée (...) avant traitement potentiellement stérilisant dans le cadre de la préservation de la fertilité » (arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation).

II.1. Indications

La congélation embryonnaire peut encore être discutée dans certains cas précis, comme pour un couple ayant déjà un enfant ou un couple déjà en procédure de FIV au moment de l'annonce de la maladie. Afin d'être dans le respect des lois de bioéthique, une procédure de FIV en urgence ne peut être proposée qu'aux patientes en couple, avec un projet parental préalable au diagnostic de la maladie. La prise en charge de ces couples au cours des consultations d'oncofertilité doit idéalement comporter, en plus de la consultation clinico-biologique, une prise en charge psychologique du couple, ensemble et séparément. En effet, le projet parental n'existait pas chez certains couples jusqu'à l'annonce de la maladie ; et c'est l'annonce du risque de stérilité post-traitement qui peut induire « par réflexe de vie » un désir d'enfant qui n'existait pas jusqu'alors. C'est pourquoi, si pour une femme le fait de préserver sa fertilité semble être une évidence, le fait de congeler des embryons dans un couple peut être problématique pour un conjoint qui n'avait jusqu'alors pas de projet parental. Le conjoint risque d'être pris dans un dilemme entre ses propres désirs et

la culpabilité de faire perdre ses chances de maternité ultérieure à sa femme.

II.2. Limites de la technique

Les limites liées à l'âge et les difficultés techniques en termes d'organisation sont les mêmes que pour la vitrification ovocytaire. Bien qu'efficace, cette technique pose des problèmes éthiques et législatifs, car la congélation embryonnaire n'est pas au sens strict du terme un moyen de préservation de la fertilité féminine. Il doit être explicitement expliqué à la patiente que les embryons ainsi obtenus ne lui « appartiendront » pas, et qu'ils ne pourront pas être transférés en cas de séparation du couple ou de décès du conjoint. Parmi les nombreuses questions pratiques et éthiques posées par la congélation embryonnaire dans ce contexte, il y a la prise en compte ou non du pronostic vital de la pathologie cancéreuse. En effet, se pose le problème du devenir des embryons en cas de décès de la patiente avec le très difficile choix auquel sera confronté le conjoint survivant, car il n'y aura pas d'autre alternative que la destruction des embryons ou le don à la recherche ; puisque le don des embryons à un autre couple sera refusé en commission d'accueil d'embryons en raison des antécédents de sa femme.

II.3. Chances de grossesse

De toutes les techniques décrites visant à préserver la fertilité féminine, la congélation d'embryons est la technique la mieux maîtrisée car faisant partie des pratiques de routine en AMP [30]. Bien que discutée sur le plan éthique dans cette indication, cette technique est celle pour laquelle il existe le plus de données concernant les chances de grossesse à long terme, et elle est probablement celle qui offre à ce jour le plus de chances aux patientes d'obtenir une grossesse après rémission grâce au transfert d'embryons congelés, avec un taux cumulé de grossesse par transfert aux alentours de 30-40 % [31]. Dans une étude française multicentrique rétrospective observationnelle sur 56 cycles de stimulation ovarienne pour FIV avant traitement gonadotoxique, le taux d'accouchement chez les couples ayant bénéficié d'un transfert d'embryons congelés après rémission était de 30 % (95 %, IC = 6,7-65,3 %) [29]. Si l'on compare ce taux avec celui publié par l'agence de la biomédecine au moment de l'étude (14,3 % en

France, ABM 2010), le taux d'accouchement semblerait supérieur à celui obtenu après transfert d'embryons congelés dans une population de couples infertiles.

III. CRYOCONSERVATION DE TISSU OVARIEN [32]

L'objectif de la cryoconservation de tissu ovarien est de cryoconserver le plus possible de follicules de réserve présents au sein du cortex ovarien. À ce stade, les ovocytes sont immatures. Selon les équipes, une ovariectomie totale ou des fragments de cortex ovarien sont prélevés par cœlioscopie, idéalement à l'aide d'un montocard transombilical pour éviter plusieurs cicatrices [33]. Le cortex ovarien est en général congelé par congélation lente [34], la taille des fragments variant d'une équipe à une autre. Certains auteurs proposent aussi d'y associer une aspiration des ovocytes immatures des follicules antraux présents dans le cortex avant sa congélation afin de maturer les ovocytes *in vitro*, mais le taux de maturation de cette technique additionnelle est très faible (3,1 %) [35].

III.1. Indications

La cryoconservation de tissu ovarien peut être réalisée à tout âge ; mais c'est la seule technique possible avant la puberté chez l'enfant. Cette technique, jugée encore expérimentale pour certains en raison du peu de recul et du faible nombre d'enfants nés [32], est en général proposée seule ou en association avec d'autres techniques en cas de traitement jugé stérilisant, comme en cas de conditionnement pré-greffe utilisant de fortes doses d'agents alkylants.

III.2. Limites de la technique

Concernant le devenir des fragments de tissu ovarien après congélation et réchauffement, la problématique est de maturer des ovocytes immatures présents dans le cortex ovarien en ovocytes matures. La folliculogénèse *in vitro* en est encore au stade de la recherche et permettrait idéalement de réaliser en laboratoire une folliculogénèse qui dure normalement près de 6 mois chez la femme

in vivo. Des naissances ont été décrites chez la souris [36] et des travaux encourageants sont en cours chez le primate non humain [37]. Certaines équipes travaillent au développement d'un « ovaire artificiel » par encapsulation des follicules primordiaux dans des matrices de fibrine pour y faire croître et maturer les follicules [38].

En cas de désir de grossesse, la plupart des équipes proposent la réalisation d'une autogreffe orthotopique, c'est-à-dire en greffant des fragments de cortex ovarien au niveau de l'ovaire laissé en place ou au niveau de la fossette ovarienne [39]. La fonction ovarienne endocrine « reprend » au bout de 4-5 mois avec des grossesses obtenues soit de façon spontanée, soit après fécondation *in vitro*. Quelques équipes ont ainsi rapporté la possibilité d'induire la puberté chez des petites filles par autogreffe de fragments de cortex ovarien [40, 41]. Si la cryoconservation de tissu ovarien fait partie du soin car prévue par la loi de bioéthique, l'autogreffe des fragments de tissu ovarien est toujours considérée en France comme de la recherche et nécessite d'inclure les patientes dans un protocole de recherche clinique.

La greffe de tissu ovarien a comme limite un risque potentiel de réintroduction de cellules cancéreuses, en particulier dans les leucémies. L'étude de Dolmans *et al.* avait montré par PCR sur des ovaires humains histologiquement sains la présence de cellules tumorales dans 33 % des ovaires de patientes atteintes de leucémie myéloïde chronique et dans 70 % des cas de leucémie lymphoblastique aiguë [42]. Cette étude a ensuite montré qu'une xéno greffe de fragments de cortex humain contenant de la maladie résiduelle à des souris NUDE entraînait des lésions péritonéales leucémiques. Ainsi, devant le potentiel malin des cellules leucémiques présentes dans le cortex ovarien congelé, de nombreuses équipes ne proposent plus cette technique de préservation de la fertilité, ni de possibilité d'autogreffe, sauf dans le cadre de protocoles de recherche [43]. L'étude de Greve *et al.* a montré des résultats plus rassurants en greffant à des souris NUDE du cortex ovarien de 25 patientes atteintes de leucémie aiguë, prélevé chez des patientes en rémission complète après une première ligne de chimiothérapie [44]. Aucune des souris greffées dans cette étude n'avait présenté de lésion péritonéale, contrairement à l'étude de Dolmans *et al.*, chez qui le tissu ovarien avait été prélevé avant toute chimiothérapie.

III.3. Chances de grossesse

La première naissance après greffe de tissu ovarien a été rapportée par l'équipe belge de Jacques Donnez en 2004 [45]. Malgré les efforts pour colliger les résultats de la part des grandes équipes [39, 46], il n'existe malheureusement pas de registres internationaux exhaustifs pour connaître précisément le nombre de greffes et de naissances. En France, d'après les dernières données du GRECOT (groupe de recherche et d'étude sur la cryoconservation de l'ovaire et du testicule), plus de 1 800 patientes ont bénéficié d'une cryoconservation de tissu ovarien, avec à ce jour une trentaine de greffes, plusieurs grossesses et 5 enfants nés après des greffes réalisées à Besançon, Limoges, Paris et Lyon. Dans le monde, une trentaine d'enfants seraient nés grâce à cette technique. L'étude multicentrique de Donnez *et al.* rapporte la naissances de 12 enfants pour 60 patientes greffées, ce qui laisserait espérer un taux de naissance de 20 % par autogreffe de tissu ovarien [39]. En revanche, aucune naissance n'a à ce jour été rapportée chez une femme adulte chez qui le tissu ovarien a été prélevé avant la puberté.

IV. MATURATION OVOCYTAIRE *IN VITRO* (MIV) [47, 48]

La maturation *in vitro* (MIV) consiste en un recueil d'ovocytes au stade de vésicule germinative à partir des follicules antraux, puis à leur mise en culture dans des milieux spécifiques en vue d'obtenir des ovocytes matures. Seuls les ovocytes ayant mûri *in vitro* seront aptes à être fécondés.

IV.1. Indications

L'intérêt de la MIV est d'éviter une stimulation ovarienne. La MIV permet de prélever des ovocytes à n'importe quel moment du cycle, sans altération de leur potentiel, ce qui rend cette technique intéressante chez des femmes devant démarrer un traitement anticancéreux en urgence. Il est en effet possible de réaliser le recueil ovocytaire en phase folliculaire ou lutéale, les ovocytes mûris *in vitro* pouvant secondairement être vitrifiés ou fécondés avant cryoconservation embryonnaire. Il a été montré que le nombre d'ovocytes

recueillis, les taux de maturation ovocytaire, les taux de fécondation ainsi que le nombre d'ovocytes matures et/ou d'embryons congelés ne différeraient pas selon la phase du cycle à laquelle était pratiquée la MIV [49].

Le cancer du sein est à ce jour la principale indication de MIV pour la préservation de la fertilité féminine. La stimulation par gonadotrophines hypophysaires en vue d'une vitrification d'ovocytes matures induit une augmentation des estrogènes circulants, potentiellement délétère dans les cancers hormono-dépendants. Malgré l'émergence de protocoles de stimulation ovarienne visant à maintenir des valeurs d'estradiol sérique dans des valeurs quasi physiologiques, l'utilisation de gonadotrophines exogènes reste théoriquement contre-indiquée dans le cancer du sein. Ainsi, la MIV semble être la stratégie de préservation de la fertilité la moins risquée pour congeler des ovocytes, surtout en cas de chimiothérapie néoadjuvante quand la tumeur est encore en place [50].

Un des autres intérêts majeurs de la MIV est de pouvoir être associée à une congélation de cortex ovarien, ce qui permet de diversifier les techniques de préservation de la fertilité pour une même patiente. En effet, la cryoconservation de cortex permet uniquement de stocker des petits follicules primordiaux ou primaires, les follicules antraux résistants peu à la congélation [51]. L'association de ces techniques permet d'offrir aux patientes des possibilités de grossesses sans procédure invasive, via l'utilisation des ovocytes vitrifiés. Pour les équipes proposant cette stratégie, le recueil ovocytaire est en général réalisé *in vivo*, par ponction transvaginale échoguidée, avant que le prélèvement de cortex ne soit pratiqué par cœlioscopie. Cependant, il est également possible de recueillir les ovocytes immatures *ex vivo*, au laboratoire après ovariectomie [52].

Cette combinaison des techniques peut s'avérer particulièrement intéressante lorsque la transplantation du cortex cryoconservé ne peut être encore envisagée, notamment dans les contextes de pathologies à fort risque d'invasion ovarienne par les cellules malignes, comme certaines hémopathies [53]. Dans ces situations, la vitrification ovocytaire semble être la meilleure stratégie de préservation de la fertilité mais celle-ci n'est pas toujours possible en cas de chimiothérapie urgente. Ainsi, lorsque la stimulation ovarienne n'est pas envisageable par manque de temps, la cryoconservation de cortex ovarien est le plus souvent proposée à ces jeunes patientes, informées qu'elles ne pourront pas, en l'état actuel des connaissances, bénéficier d'une autogreffe compte tenu du risque de réintroduction de cellules malignes. Dans ce cas, l'indication de cryoconservation de tissu ovarien

parie sur la future émergence de techniques de folliculogénèse *in vitro* qui permettraient d'obtenir, au laboratoire, des follicules matures à partir de follicules primordiaux, sans nécessité de greffe et donc sans risque de réintroduction de cellules malignes. Cependant, ces techniques sont encore au stade de la recherche fondamentale. Ainsi, la MIV associée au prélèvement de cortex pourrait représenter une méthode de préservation de la fertilité, dénuée de risque de transmission de cellules malignes. Proposer une MIV combinée au prélèvement de tissu ovarien semble fondamentale d'un point de vue éthique, dans un contexte de préservation de la fertilité pour des jeunes femmes susceptibles d'avoir de la maladie résiduelle dans leurs ovaires.

IV.2. Limites de la technique

Très peu d'équipes en France proposent cette technique, jugée pour d'autres encore trop expérimentale pour être proposée comme technique de préservation de la fertilité [8]. Seule une certaine proportion des ovocytes immatures recueillis lors de la ponction ont la capacité de murer *in vitro* puis d'être fécondés, les taux de maturation variant entre 20 et 80 % selon les études [54]. Il semble donc primordial d'améliorer ces techniques de MIV, vraisemblablement en optimisant les milieux de culture [54]. Suite à la ponction, les ovocytes peuvent être cryoconservés avant ou après la MIV (au stade immature de vésicule germinale, ou au stade mature de métaphase II). Les taux de maturation semblent meilleurs lorsque les ovocytes sont maturés d'emblée et vitrifiés au stade de métaphase II, par rapport à une congélation plus précoce [55].

IV.3. Chances de grossesse

Si une grossesse a été rapportée dès le début des années 80 après MIV d'ovocytes recueillis immatures dans les suites d'une stimulation ovarienne, il a fallu environ treize ans après la première naissance post-fécondation *in vitro* (FIV) pour que la première grossesse après MIV sans administration de gonadotrophines exogènes soit rapportée chez la femme en 1991 [56]. Le nombre d'ovocytes matures congelés est le principal critère actuel de « réussite » des tentatives de MIV dans le cadre de la préservation de la fertilité car il est potentiellement corrélé aux chances de grossesses futures. Cependant, le nombre optimal d'ovocytes MIV vitrifiés nécessaire à l'obtention d'une grossesse n'est

actuellement pas connu du fait du faible recul de cette technique en préservation de la fertilité. Dans le cadre des programmes de FIV conventionnelle, ce nombre a été estimé entre 8 et 15 [57], mais ces résultats ne semblent pas transposables à la MIV.

La MIV est une stratégie relativement récente pour la préservation de la fertilité, et peu d'études sont disponibles pour estimer les résultats de la MIV dans ce cadre [58]. Le nombre moyen d'ovocytes recueillis varie entre 8 et 17. Les taux de maturation *in vitro* varient entre 48 et 79 %, ce qui semble être équivalent à ceux rapportés chez des femmes infertiles sans pathologie cancéreuse. Enfin, la moyenne du nombre total d'ovocytes matures vitrifiés varie entre 6 et 12, ce qui est similaire aux résultats obtenus en stimulation ovarienne avec un protocole utilisant les inhibiteurs de l'aromatase.

La MIV constitue une technique bien établie pour le traitement de l'infertilité chez les patientes atteintes de syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). À ce jour dans le monde sont rapportées plus de 5 000 naissances post-MIV chez des patientes SOPK ou normo-ovulantes en dehors du cadre de la préservation de la fertilité [59]. Les résultats rapportés après vitrification d'ovocytes maturés *in vitro* semblent moins bons que ceux obtenus avec la même technique de congélation appliquée à des ovocytes maturés *in vivo* après stimulation ovarienne [60], même si certaines équipes rapportent des taux de grossesse comparables à ceux de la FIV conventionnelle dans certains cas sélectionnés [61]. De plus amples études sont nécessaires afin d'évaluer précisément les chances de grossesse post-MIV.

Dans le cadre de la préservation de la fertilité féminine, la première grossesse a été rapportée en 2014 grâce à des ovocytes maturés *in vitro* [62]. Les ovocytes ont été ponctionnés *ex vivo* après ovariectomie chez une jeune patiente présentant une tumeur ovarienne de type « borderline ». Plus de données et de recul sont nécessaires pour connaître le réel potentiel de ces ovocytes maturés *in vitro*, cryoconservés dans les situations de pathologie cancéreuse.

Concernant les risques potentiels pour les enfants nés après MIV, les données sont rassurantes : il ne semble pas y avoir d'augmentation des taux d'anomalies fœtales ou néo-natales comparativement aux enfants issus de FIV classique ou de grossesses naturelles, en particulier pas plus de maladies génétiques soumises à l'empreinte [61, 63].

CONCLUSION

Étant donné l'amélioration des chances de survie après cancer et le poids médico-légal croissant de l'information à donner aux patientes avant traitement gonadotoxique, il semblerait maintenant nécessaire d'harmoniser les pratiques de préservation de la fertilité féminine, idéalement dans le cadre de réseaux d'oncofertilité, afin d'offrir aux patientes atteintes d'un cancer les mêmes opportunités de soins sur le territoire français [49].

La préservation des gamètes en vue d'une utilisation future en assistance médicale à la procréation (AMP) après traitement anticancéreux doit s'inscrire dans le parcours personnalisé de soins des enfants et des femmes jeunes en âge de procréer dès qu'un traitement gonadotoxique est envisagé. Chez la femme, l'information est parfois difficile quand les techniques de préservation de la fertilité sont limitées par une réserve ovarienne folliculaire déjà altérée au moment du diagnostic de cancer. L'organisation de ces techniques est parfois compliquée sur le plan logistique. La coopération entre oncologues et médecins de la reproduction doit être étroite et bien codifiée pour tenter de préserver des gamètes ou du tissu germinale en retardant au minimum le début du traitement anti-cancéreux. La balance risque-bénéfice de chaque stratégie doit être évaluée de façon personnalisée, avec le plus d'objectivité possible sur les chances de grossesse ultérieure offertes à la patiente. Chaque patiente doit être informée des risques mais aussi et surtout des inconnues concernant les chances de grossesse qui lui seront offertes en cas de réutilisation. D'autre part, l'information devra ne pas sous-estimer la possibilité d'une grossesse spontanée même après des chimiothérapies très toxiques [64], devant faire envisager une contraception en cas d'absence de désir de grossesse.

Actuellement, bien que de nombreux auteurs s'accordent sur l'intérêt de créer des centres de références d'oncofertilité avec des registres de suivi [65], il n'existe pas à notre connaissance de fichiers ni internationaux, ni nationaux colligeant spécifiquement le suivi au long cours des enfants nés d'ovocytes, d'embryons ou de tissu germinale congelés dans le cadre d'une préservation de la fertilité.

Bibliographie

- [1] ETUDVICAN14. La vie deux ans après un diagnostic de cancer - De l'annonce à l'après-cancer. 2014.
- [2] Levine J, Canada A, Stern CJ. Fertility preservation in adolescents and young adults with cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:4831-41.
- [3] Gougeon A. Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. *Maturitas* 1998;30:137-42.
- [4] Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000;53:59-72.
- [5] Mazur P, Seki S, Pinn IL, Kleinhans FW, Edashige K. Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes. *Cryobiology* 2005;51:29-53.
- [6] Courbiere B, Perrin J, Conte-Devolx B, Brue T, Christin-Maitre S. Contrôle génétique du capital folliculaire. *EMC - Gynécologie* 2013;8:1-7. doi:10.1016/S0246-1064(12)44333-X.
- [7] Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One* 2010;5:e8772.
- [8] Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril* 2013;100:1214-23.
- [9] Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984;21:407-26.
- [10] Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod Oxf Engl* 1999;14:3077-9.
- [11] Rienzi L, Cobo A, Paffoni A, Scarduelli C, Capalbo A, Vajta G *et al.* Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum Reprod Oxf Engl* 2012;27:1606-12. doi:10.1093/humrep/des088.
- [12] Noyes N, Porcu E, Borini A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reprod Biomed Online* 2009;18:769-76.
- [13] ACOG: Committee Opinion No. 584: oocyte cryopreservation. *Obstet Gynecol* 2014;123:221-2. doi:10.1097/01.AOG.0000441355.66434.6d.
- [14] Decanter C, Morschhauser F, Pigny P, Lefebvre C, Gallo C, Dewailly D. Anti-Müllerian hormone follow-up in young women treated by chemotherapy for lymphoma: preliminary results. *Reprod Biomed Online* 2010;20:280-5.
- [15] Potdar N, Gelbaya TA, Nardo LG. Oocyte vitrification in the 21st century and post-warming fertility outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2014;29:159-76. doi:10.1016/j.rbmo.2014.03.024.
- [16] Lawrenz B, Fehm T, von Wolff M, Soekler M, Huebner S, Henes J *et al.* Reduced pretreatment ovarian reserve in premenopausal female patients with Hodgkin lymphoma or non-Hodgkin-lymphoma-evaluation by using anti-müllerian hormone and retrieved oocytes. *Fertil Steril* 2012;98:141-4. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.04.021.
- [17] Schenker JG, Meirou D, Schenker E. Stress and human reproduction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992;45:1-8.
- [18] Rossi BV, Ashby RK, Srouji SS. Embryo banking between induction and consolidation chemotherapy in women with leukemia. *Fertil Steril* 2011;96:1412-4. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.09.038.
- [19] Soleimani R, Heytens E, Darzynkiewicz Z, Oktay K. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. *Aging (Albany NY)* 2011;3:782-93.
- [20] Meirou D, Epstein M, Lewis H, Nugent D, Gosden RG. Administration of cyclophosphamide at different stages of follicular maturation in mice: effects on reproductive performance and fetal malformations. *Hum Reprod Oxf Engl* 2001;16:632-7.
- [21] Hudson MM. Reproductive outcomes for survivors of childhood cancer. *Obstet Gynecol* 2010;116:1171-83.
- [22] Nagarajan R, Robison LL. Pregnancy outcomes in survivors of childhood cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005:72-6.
- [23] Decanter C, Gligorov J. Oocyte/embryo cryopreservation before chemotherapy for breast

cancer. *Gynécologie Obstétrique Fertil* 2011;39:501-3. doi:10.1016/j.gyobfe.2011.07.011.

[24] Oktay K, Buyuk E, Davis O, Yermakova I, Veeck L, Rosenwaks Z. Fertility preservation in breast cancer patients: IVF and embryo cryopreservation after ovarian stimulation with tamoxifen. *Hum Reprod Oxf Engl* 2003; 18:90-5.

[25] Cobo A, Serra V, Garrido N, Olmo I, Pellicer A, Remohí J. Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes. *Fertil Steril* 2014 Oct;102(4):1006-1015.e4. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.06.019.

[26] Stoop D, Ermini B, Polyzos NP, Haentjens P, De Vos M, Verheyen G *et al.* Reproductive potential of a metaphase II oocyte retrieved after ovarian stimulation: an analysis of 23 354 ICSI cycles. *Hum Reprod Oxf Engl* 2012;27:2030-5. doi:10.1093/humrep/des131.

[27] Garcia-Velasco JA, Domingo J, Cobo A, Martínez M, Carmona L, Pellicer A. Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. *Fertil Steril* 2013;99:1994-9. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.02.004.

[28] Cobo A, Remohí J, Chang CC, Nagy ZP. Oocyte cryopreservation for donor egg banking. *Reprod Biomed Online* 2011;23:341-6.

[29] Courbiere B, Decanter C, Bringer-Deutsch S, Rives N, Mirallié S, Pech JC *et al.* Emergency IVF for embryo freezing to preserve female fertility: a French multicentre cohort study. *Hum Reprod Oxf Engl* 2013;28:2381-8. doi:10.1093/humrep/det268.

[30] Wong KM, Mastenbroek S, Repping S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril* 2014;102:19-26. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.05.027.

[31] Friedler S, Koc O, Gidoni Y, Raziell A, Ron-El R. Ovarian response to stimulation for fertility preservation in women with malignant disease: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2012;97:125-33. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.10.014.

[32] Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Ovarian tissue cryopreservation: a committee opinion. *Fertil Steril* 2014;101:1237-43. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.02.052.

[33] Kikuchi I, Kagawa N, Silber S, Kuwayama M, Takehara Y, Aono F *et al.*

Oophorectomy for fertility preservation via reduced-port laparoscopic surgery. *Surg Innov* 2013;20:219-24. doi:10.1177/1553350612449074.

[34] Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2005;10:729-34.

[35] Wilken-Jensen HN, Kristensen SG, Jeppesen JV, Yding Andersen C. Developmental competence of oocytes isolated from surplus medulla tissue in connection with cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2014;93:32-7. doi:10.1111/aogs.12264.

[36] O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod* 2003;68:1682-6. doi:10.1095/biolreprod.102.013029.

[37] Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertil Steril* 2013;99:1523-33. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.03.043.

[38] Luyckx V, Dolmans M-M, Vanacker J, Legat C, Fortuño Moya C, Donnez J *et al.* A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. *Fertil Steril* 2014;101:1149-56. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.12.025.

[39] Donnez J, Dolmans M-M, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Sanchez Serrano M, Schmidt KT *et al.* Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril* 2013;99:1503-13. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.03.030.

[40] Ernst E, Kjærsgaard M, Birkebæk NH, Clausen N, Andersen CY. Case report: stimulation of puberty in a girl with chemo- and radiation therapy induced ovarian failure by transplantation of a small part of her frozen/thawed ovarian tissue. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2013;49:911-4. doi:10.1016/j.ejca.2012.09.028.

[41] Poirot C, Abirached F, Prades M, Coussieu C, Bernaudin F, Piver P. Induction of puberty by autograft of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2012;379:588. doi:10.1016/S0140-6736(11)61781-9.

[42] Dolmans MM, Marinescu C, Saussoy P, Van Langendonck A, Amorim C, Donnez J.

- Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe. *Blood* 2010;116:2908-14.
- [43] Amiot C, Angelot-Deletre F, Zver T, Alvergnas-Vieille M, Saas P, Garnache-Ottou F *et al.* Minimal residual disease detection of leukemic cells in ovarian cortex by eight-color flow cytometry. *Hum Reprod Oxf Engl* 2013;28:2157-67. doi:10.1093/humrep/det126.
- [44] Greve T, Clasen-Linde E, Andersen MT, Andersen MK, Sørensen SD, Rosendahl M *et al.* Cryopreserved ovarian cortex from patients with leukemia in complete remission contains no apparent viable malignant cells. *Blood* 2012;120:4311-6. doi:10.1182/blood-2012-01-403022.
- [45] Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J *et al.* Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364:1405-10.
- [46] Dolmans M-M, Jadoul P, Gilliaux S, Amorim CA, Luyckx V, Squifflet J *et al.* A review of 15 years of ovarian tissue bank activities. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:305-14. doi:10.1007/s10815-013-9952-x.
- [47] Chian R-C, Uzelac PS, Nargund G. *In-vitro* maturation of human immature oocytes for fertility preservation. *Fertil Steril* 2013;99:1173-81. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.141.
- [48] Berwanger AL, Finet A, El Hachem H, le Parco S, Hesters L, Grynberg M. New trends in female fertility preservation: *in-vitro* maturation of oocytes. *Future Oncol Lond Engl* 2012;8:1567-73. doi:10.2217/fon.12.144.
- [49] Maman E, Meirou D, Brengauz M, Raanani H, Dor J, Hourvitz A. Luteal phase oocyte retrieval and *in-vitro* maturation is an optional procedure for urgent fertility preservation. *Fertil Steril* 2011;95:64-7. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.06.064.
- [50] Grynberg M, El Hachem H, de Bantel A, Benard J, le Parco S, Fanchin R. In vitro maturation of oocytes: uncommon indications. *Fertil Steril* 2013;99:1182-8. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.090.
- [51] Gosden RG. Gonadal tissue cryopreservation and transplantation. *Reprod Biomed Online* 2002;4(1):64-7.
- [52] Huang JYJ, Tulandi T, Holzer H, Tan SL, Chian R-C. Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval of immature oocytes followed by *in-vitro* maturation and vitrification: an additional strategy of fertility preservation. *Fertil Steril* 2008;89:567-72. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.03.090.
- [53] Dolmans M-M, Luyckx V, Donnez J, Andersen CY, Greve T. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertil Steril* 2013;99:1514-22. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.03.027.
- [54] Combelles CMH, Chateau G. The use of immature oocytes in the fertility preservation of cancer patients: current promises and challenges. *Int J Dev Biol* 2012;56:919-29. doi:10.1387/ijdb.120132cc.
- [55] Lee JA, Sekhon L, Grunfeld L, Copperman AB. *In-vitro* maturation of germinal vesicle and metaphase I eggs prior to cryopreservation optimizes reproductive potential in patients undergoing fertility preservation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2014;26:168-73. doi:10.1097/GCO.000000000000062.
- [56] Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture *in-vitro* and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991;55:109-13.
- [57] Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod Oxf Engl* 2011;26:1768-74. doi:10.1093/humrep/der106.
- [58] Lee JA, Sekhon L, Grunfeld L, Copperman AB. *In-vitro* maturation of germinal vesicle and metaphase I eggs prior to cryopreservation optimizes reproductive potential in patients undergoing fertility preservation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2014;26:168-73. doi:10.1097/GCO.000000000000062.
- [59] Chian R-C, Uzelac PS, Nargund G. *In-vitro* maturation of human immature oocytes for fertility preservation. *Fertil Steril* 2013;99:1173-81. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.141.
- [60] Chian R-C, Huang JYJ, Gilbert L, Son W-Y, Holzer H, Cui SJ *et al.* Obstetric outcomes following vitrification of *in-vitro* and *in-vivo* matured oocytes. *Fertil Steril* 2009;91:2391-8. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.04.014.
- [61] Son W-Y, Lee S-Y, Yoon S-H, Lim J-H. Pregnancies and deliveries after transfer of human blastocysts derived from *in-vitro* matured oocytes in *in-vitro* maturation cycles. *Fertil Steril*

2007;87:1491-3. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.11.027.

[62] Prasath EB, Chan MLH, Wong WHW, Lim CJW, Tharmalingam MD, Hendricks M *et al.* First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from *in-vitro* matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient. Hum Reprod Oxf Engl 2014;29:276-8. doi:10.1093/humrep/det420.

[63] Fadini R, Mignini Renzini M, Guarnieri T, Dal Canto M, De Ponti E, Sutcliffe A *et al.* Comparison of the obstetric and perinatal outcomes of children conceived from *in vitro* or

in vivo matured oocytes in *in-vitro* maturation treatments with births from conventional ICSI cycles. Hum Reprod Oxf Engl 2012;27:3601-8. doi:10.1093/humrep/des359.

[64] Assouline E, Crocchiolo R, Prebet T, Broussais F, Coso D, Gamberre M *et al.* Impact of reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation on women's fertility. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2013;13:704-10. doi:10.1016/j.clml.2013.05.014.

[65] De Ziegler D, Streuli I, Vasilopoulos I, Decanter C, This P, Chapron C. Cancer and fecundity issues mandate a multidisciplinary approach. Fertil Steril 2010;93:691-6.