

# Les techniques et indications actuelles de préservation de la fertilité - Les techniques médicales

M. TOLEDANO <sup>1</sup>, F. LAMAZOU <sup>1, 3</sup>, L. HESTERS <sup>2</sup>, N. FRYDMAN <sup>2</sup>,  
R. FANCHIN <sup>1, 3, 4</sup>, M. GRYNBERG <sup>1, 3, 4 \*</sup>  
(Clamart)

## Résumé

*L'amélioration, au cours de la dernière décennie, de l'espérance de vie des enfants et femmes jeunes atteints de cancer a rendu compte de l'importance de développer des techniques de préservation de la fertilité afin de pallier les effets indésirables des traitements anticancéreux sur la fonction gonadique. La prise en charge sera essentiellement fonction de l'apparition ou non de la puberté ainsi que du degré d'urgence à instaurer le traitement potentiellement stérilisant. Les techniques actuellement disponibles font essentiellement appel à la cryopréservation embryonnaire et/ou ovocytaire après stimulation ovarienne ainsi qu'à des techniques chirurgicales de congélation de fragments de corticale ovarienne. Plus récemment, les techniques de maturation ovocytaire in vitro sont venues s'ajouter à l'arsenal thérapeutique et permettent la réalisation d'une cryopréservation embryonnaire et/ou ovocytaire indépendamment de la phase du cycle, et*

Hôpital Antoine Bécclère - AP-HP - 157 rue de la Porte de Trivaux - 92141 Clamart

1 - Service de gynécologie-obstétrique et médecine de la reproduction

2 - Laboratoire de biologie de la reproduction

3 - Université Paris-Sud

4 - INSERM U782

\* Correspondance : michael.grynberg@abc.aphp.fr

*sans stimulation ovarienne, ce qui la rend particulièrement intéressante en cas d'urgence ou de pathologie hormonodépendante. Enfin, les agonistes de la GnRH administrés en cours de chimiothérapie ont également été proposés dans le but de prévenir ou diminuer la gonadotoxocité des traitements, même si leur efficacité reste à démontrer.*

*Mots clés : préservation de la fertilité, cryopréservation ovarienne, cryopréservation ovocytaire, maturation in vitro, agonistes de la GnRH*

### **Déclaration publique d'intérêt**

Je soussigné, Michaël Grynberg, déclare ne pas avoir d'intérêt direct ou indirect (financier ou en nature) avec un organisme privé, industriel ou commercial en relation avec le sujet présenté.

## **INTRODUCTION**

Les récents progrès en termes de prise en charge diagnostique et thérapeutique des pathologies oncologiques ont permis, au cours de la dernière décennie, une amélioration significative de l'espérance de vie des enfants et jeunes adultes atteints de cancer [1]. En conséquence, les questions relatives à la qualité de vie, et notamment la problématique de la préservation de la fertilité se sont rapidement posées, faisant l'objet de nombreux programmes de recherche [2]. Les effets de la chirurgie, de la chimiothérapie et/ou de la radiothérapie réalisées ou administrées au cours de l'adolescence ou au cours de la vie reproductive peuvent conduire, chez les patientes survivantes, à une impossibilité de mener à bien leur projet parental après guérison [3]. Ainsi, parallèlement à l'augmentation des taux de survie après cancer, s'est développée une prise de conscience de l'intérêt de la préservation de la fertilité [4]. Ces progrès ont conduit la société américaine d'oncologie clinique (ASCO) à émettre des recommandations, destinées aux cliniciens devant conseiller les patientes en âge de procréer, atteintes de cancer, afin de les informer sur les techniques utilisables pour la préservation de leur fertilité future [5]. Aujourd'hui,

seule la cryopréservation d'embryons est considérée par l'American Society of Reproductive Medicine (ASRM) comme une procédure « non expérimentale » de préservation de la fertilité féminine [6]. Les autres techniques médicales actuellement utilisées comprennent la cryopréservation d'ovocytes matures, la cryopréservation de tissu ovarien, et la suppression ovarienne [7]. Contrairement à l'homme pour qui l'autoconservation de spermatozoïdes est bien établie, la préservation de la fertilité des femmes recevant un traitement gonadotoxique est encore à l'étude, de nombreuses voies thérapeutiques sont donc encore à explorer.

## I. LE STATUT FOLLICULAIRE OVARIEN ET SON ÉVALUATION

La gamétogenèse dans l'ovaire est un processus complexe qui démarre dès la vie intra-utérine. L'ovaire humain possède un nombre de follicules primordiaux fixe, maximal dès le 5<sup>e</sup> mois de la vie fœtale. Ce pool de follicules va progressivement diminuer avec l'âge, de manière bi-exponentielle. Le déclin ovocytaire s'accélère à partir de l'âge de 37 ans où sont encore présents 25 000 follicules primordiaux. Ce stade survient environ 12 à 15 ans avant la ménopause où l'on ne trouve plus que 1 000 ovocytes restants [8]. Les mécanismes à l'origine de cette atrophie sont mal connus et mettent en jeu de multiples facteurs codés par des gènes autosomiques et d'autres situés sur le chromosome X [9]. L'existence de cellules souches ovariennes a récemment été suggérée chez la souris [10] mais ces cellules n'ont jamais pu être identifiées dans l'ovaire humain.

L'exposition à des traitements gonadotoxiques tels que les chimiothérapies et la radiothérapie constitue une des principales causes d'accélération de la perte folliculaire. Ainsi, les patientes traitées par chimiothérapie avec ou sans radiothérapie constituent une population à fort risque d'insuffisance ovarienne prématurée (IOP) d'origine iatrogène [11, 12]. En effet, parmi les adolescentes traitées pour cancer, le risque d'IOP est multiplié par 4. Parmi les femmes âgées de 21 à 25 ans, ce risque est multiplié par 27 [13].

L'évaluation du statut folliculaire ou réserve ovarienne constitue le préambule indispensable à toute instauration de préservation de fertilité, permettant de poser l'indication et de guider la prise en charge thérapeutique. En effet, cette réserve ovarienne, ou âge fonctionnel

ovarien, inclut à la fois un aspect quantitatif, caractérisé par la taille du pool folliculaire restant, et un aspect qualitatif relatif aux ovocytes. Le déclin de cette réserve, étroitement corrélé au vieillissement ovarien, est responsable d'une baisse de la fertilité par réduction du nombre des follicules primordiaux et altération de la qualité ovocytaire.

Les paramètres d'évaluation du statut folliculaire ovarien sont à la fois cliniques (âge, caractéristiques menstruelles), hormonaux et échographiques.

On s'attachera notamment à rechercher des troubles du cycle à type de raccourcissement des cycles voire d'aménorrhée, plus ou moins associés à des signes de carence estrogénique, notamment des bouffées de chaleur. Cette situation est volontiers retrouvée chez les patientes ayant déjà reçu un certain nombre de traitements gonadotoxiques, demandeuses de préservation de leur fertilité avant une intensification thérapeutique.

L'échographie ovarienne au troisième jour du cycle permet de dénombrer les petits follicules antraux de 2 à 9 mm qui répondront à l'administration de gonadotrophines exogènes. En effet, ce nombre de follicules dits sélectionnables est corrélé à l'âge [14, 15] ainsi qu'à la réponse ovarienne après stimulation [16] et aux taux de grossesses obtenus après fécondation *in vitro* [17]. À ce jour, le compte folliculaire antral constitue l'examen « référence » d'évaluation de la réserve ovarienne.

Des dosages hormonaux statiques permettent encore d'affiner l'évaluation du statut folliculaire ovarien. Ainsi, c'est sur les rapports entre les concentrations des hormones ovariennes, en particulier inhibine B et estradiol, et hypophysaires, notamment FSH, dosées pendant la transition lutéo-folliculaire, que reposent les tests hormonaux utilisés pour l'évaluation du statut folliculaire. D'une façon schématique, ils analysent la capacité des follicules sélectionnables à produire de l'inhibine B et peuvent refléter la présence précoce d'un follicule sélectionné synthétisant de l'estradiol en réponse à l'élévation inter-cyclique de FSH. Cependant, la force de la relation entre ces 3 marqueurs hormonaux et le compte des follicules antraux peut être diminuée, notamment chez des patientes ayant des signes de vieillissement ovarien [18]. La principale limite de ces marqueurs hormonaux d'évaluation du statut folliculaire ovarien est représentée par la nécessité de les faire pratiquer en phase folliculaire précoce, ce qui est le plus souvent incompatible avec l'urgence de la préservation de la fertilité.

Plus récemment, le dosage sérique de l'hormone anti-müllérienne (AMH) est venu supplanter la triade hormonale classique d'évaluation

de la réserve ovarienne. En effet, comparativement aux autres marqueurs usuels du statut folliculaire ovarien (FSH, estradiol, et inhibine B, et CFA), l'AMH sérique est le paramètre le plus sensible au vieillissement ovarien [19]. Le nombre de follicules antraux visibles en échographie en début de phase folliculaire est plus étroitement corrélé au taux d'AMH sériques, en comparaison à ceux de FSH, estradiol, inhibine B, faisant de l'AMH le meilleur représentant du statut folliculaire ovarien [20]. De plus, il existe une corrélation entre les concentrations sériques d'AMH et l'intensité de la réponse ovarienne à une stimulation [21, 22].

Un des principaux intérêts du dosage d'AMH sérique chez les patientes traitées ou suivies dans le cadre d'une pathologie oncologique tient à son absence de variation intra-cyclique [23]. Elle permet ainsi de prédire à tout moment du cycle la réponse à des stimulations ovariennes [24] qui devront souvent être menées « en urgence », sans pouvoir par conséquent attendre un bilan de réserve ovarienne en phase folliculaire précoce. De plus, l'AMH étant sécrétée de manière indépendante de la FSH, son dosage sérique reste utilisable, contrairement aux autres paramètres hormonaux, chez les patientes pré-pubères, qui ont par définition un axe hypothalamo-hypophysogonadotrope quiescent ou encore immature.

## II. TOXICITÉ DES TRAITEMENTS ANTICANCÉREUX

### II.1. Toxicité gonadique

Les perturbations de la fonction gonadique chez les enfants ou jeunes femmes traitées pour cancer peuvent être d'origine centrale ou périphérique, survenant après chimiothérapie systémique ou radiothérapie localisée au pelvis ou à la moelle épinière, ou encore irradiation corporelle totale. Par ailleurs, une irradiation de l'axe hypothalamo-hypophysaire après radiothérapie crâniale peut également être à l'origine d'une hypofertilité voire d'une infertilité.

Les protocoles de traitement de ces pathologies malignes sont en permanente évolution avec pour objectif d'améliorer la survie, tout en réduisant les effets indésirables. La nature variable de l'atteinte gonadique après chimiothérapie et/ou radiothérapie rend souvent difficile la possibilité de prédire la fertilité future des patientes. En effet, la fonction gonadique résultante est fonction de plusieurs paramètres,

notamment le statut folliculaire ovarien avant traitement, les drogues utilisées et la susceptibilité individuelle. Il est toutefois possible d'estimer des risques globaux, fonction de la pathologie et des stratégies thérapeutiques habituelles (Tableau 1). Néanmoins, les risques de dommages gonadiques restent toujours très difficiles à appréhender de manière précise et le conseil des adolescentes et de leur famille concernant leur fertilité future constitue un des challenges de cette prise en charge. De plus, des cas de patientes avec reprise de la fonction ovarienne après des traitements supposés être stérilisants ont été rapportés [25]. Ces données montrent l'importance et la difficulté de l'information à fournir aux patientes.

*Figure 1 - Pouvoir stérilisant des traitements anticancéreux en fonction du type de cancer*

Souvent stérilisants	Parfois stérilisants	Jamais stérilisants
Ovaires	Rein	Poumon
Hémopathies	Rectum	Mélanome
Col utérin	Système nerveux	Thyroïde
	Sein	

## II.2. Effets de la radiothérapie

Les gonades sont des organes sensibles aux radiations. Chez la femme, l'irradiation abdominale, pelvienne ou corporelle totale peut être source d'une part de dommage ovarien, mais également utérin. Le degré d'altération dépend de la dose d'irradiation, de sa localisation, du fractionnement des doses et de l'âge féminin au moment du traitement [13, 26, 27]. La perte ovocytaire post-radique a été montrée dans le modèle statistique de Faddy-Gosden, comme étant proportionnelle à l'importance du pool ovocytaire initial [28]. Ainsi, la dose effective stérilisante est de 20,3 Gy à la naissance, 18,4 Gy à 10 ans, 16,5 Gy à 20 ans et 14,3 Gy à 30 ans [29].

L'irradiation de l'utérus au cours de l'enfance et de l'adolescence s'associe à une réduction du volume utérin dans 40 % des cas, ainsi qu'à une augmentation de l'incidence des fausses couches précoces et des retards de croissance *in utero* [28, 30], en rapport avec la réduction de l'élasticité des fibres musculaires du myomètre et l'altération de la vascularisation utérine.

Enfin, l'irradiation crâniale, fréquemment utilisée dans le traitement des tumeurs du système nerveux central, peut entraîner des perturbations profondes de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique. Le traitement de l'infertilité dans ces cas particuliers nécessitera l'administration de gonadotrophines exogènes [31].

### II.3. Effets de la chimiothérapie

La cytotoxicité des chimiothérapies anticancéreuses peut être à l'origine d'un déficit gonadique dont la nature et l'importance dépendent de la ou des drogues utilisées, de la dose reçue, et de l'âge [31-33]. Si toutes les chimiothérapies peuvent perturber la fonction gonadique, la procarbazine, le cisplatine, les agents alkylants (cyclophosphamide, melphalan, chlorambucil) restent les molécules les plus gonadotoxiques. La fréquente association de ces drogues rend difficile l'analyse de la gonadotoxicité propre à chaque molécule.

Les perturbations du cycle cellulaire, de la croissance et de la maturation folliculaire rendent compte de la toxicité gonadique des chimiothérapies. Des biopsies ovariennes chez des patientes ayant reçu un traitement à base de cyclophosphamide révèlent soit l'absence complète d'ovocytes, soit la présence d'ovocytes pré-antraux fibrosés et une absence de signes de maturation folliculaire [34-36]. Dans de nombreux cas, l'histologie de ces ovaires post-chimiothérapie est comparable à celle des ovaires post-ménopausiques. En association à la destruction des follicules ovariens, il existe une perte des cellules productrices de stéroïdes.

Byrne *et al.*, qui ont suivi une cohorte de femmes traitées pour cancer avant l'âge de 20 ans, ont rapporté que 42 % de ces femmes traitées par radiothérapie et chimiothérapie étaient ménopausées avant 31 ans, contre 5 % dans le groupe contrôle, avec un risque global d'IOP d'environ 60 % [37]. Dans cette étude, la procarbazine et les agents alkylants étaient plus particulièrement gonadotoxiques. Des grossesses spontanées ont également été rapportées chez 28 % des femmes traitées pour cancer [14], bien qu'une altération de la fonction ovarienne ait été préalablement documentée [31, 38]. Les conférences de consensus récentes (St Gallen 2007 et St Paul de Vence 2007) ont proposé un recul de 24 mois pour définir une aménorrhée post-chimiothérapie en raison des cas tardifs de reprise de la fonction ovarienne. Chez des femmes de plus de 25 ans, le taux d'aménorrhée après traitement augmente jusqu'à 80-90 %, avec quasiment toutes les patientes ayant une IOP, et des taux de grossesse spontanée de seulement 5 % [39, 40].

## II.4. Effets de la pathologie

Bien que les traitements du cancer soient le principal facteur responsable de l'infertilité de ces patientes, la pathologie elle-même semble avoir un rôle dans la dysfonction gonadique. Ce phénomène est plus volontiers décrit chez l'homme avec plus de 70 % des patients atteints de maladie de Hodgkin présentant, préalablement à tout traitement, des altérations de la qualité du sperme [41, 42]. Par ailleurs, la fièvre, l'anorexie et la douleur sont également responsables de perturbation du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique. L'état d'hypercatabolisme en rapport avec les pathologies malignes est ainsi vraisemblablement également impliqué dans l'hypofertilité et la diminution de la réponse à la stimulation ovarienne, avant toute chimiothérapie ou radiothérapie, chez des patientes ayant initialement des paramètres de réserve ovarienne normaux [43].

## II.5. Évaluation des effets des chimiothérapies sur les marqueurs de la fonction ovarienne

Quelques études récentes ont évalué les paramètres du statut folliculaire ovarien après chimiothérapie. Schmidt *et al.* ont étudié la fonction gonadique de 8 patientes traitées pour cancer du sein. Toutes les patientes ont retrouvé des cycles mais 3 d'entre elles ont présenté des cycles irréguliers et les 5 autres un effondrement de l'inhibine B et une élévation nette de la FSH, suggérant un certain degré d'altération de la réserve folliculaire sous-jacente [44]. Anderson *et al.* ont montré que les taux d'AMH sérique chutaient de façon plus constante et rapide que les taux d'estradiol ou de FSH après chimiothérapie chez des patientes atteintes d'un cancer du sein [45]. De plus les taux sériques d'inhibine B et des FSH variaient peu, ce qui pourrait indiquer que la chimiothérapie touche plus les follicules primordiaux et pré-antraux que les follicules cycliques. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle, même sans altération notable des cycles menstruels, des dégâts ovariens liés aux chimiothérapies sont possibles et peuvent rester sous-diagnostiqués. La meilleure sensibilité de l'AMH par rapport à la FSH ou l'inhibine B a été confirmée récemment par une étude de suivi de patientes traitées pour lymphome de Hodgkin pendant l'enfance [46]. Pour d'autres auteurs [47, 48], c'est plutôt la combinaison entre le compte folliculaire antral et les dosages d'AMH qui donne la meilleure valeur prédictive de la réserve folliculaire chez des patientes ayant bénéficié d'une chimiothérapie pour lymphome de



Hodgkin ou pour un autre cancer hématologique, avec une sensibilité de 83 % et une spécificité de 88 %. De plus, les taux pré-thérapeutiques d'AMH semblent être prédictifs du risque d'aménorrhée post-chimiothérapie, cette occurrence étant significativement plus élevée chez les patientes dotées des taux d'AMH bas.

À l'avenir, on peut espérer pouvoir cibler avant la chimiothérapie les femmes chez qui une insuffisance ovarienne est probable après traitement, pour proposer à bon escient une préservation de la fertilité.

## **II.6. Toxicité sur les grossesses ultérieures au traitement anti-cancéreux**

À ce jour, il n'existe pas d'étude chez l'humain ayant spécifiquement analysé la qualité des ovocytes et des embryons obtenus après une première cure de chimiothérapie. Il est bien connu que les agents chimiothérapeutiques peuvent induire des mutations de l'ADN, ainsi que des cassures dans la structure de la double hélice et des dommages oxydatifs, à la fois dans les cellules somatiques et germinales. Chez la souris, l'exposition au cyclophosphamide peu avant une fécondation induit un fort taux de fausses couches et de malformations fœtales [49]. Les études ayant porté sur le devenir des grossesses chez les patientes ayant survécu après cancer n'ont pu mettre en évidence d'augmentation du risque de malformations congénitales ou de pathologies malignes dans la descendance [50, 51]. Cependant, ces études ont évalué des patientes ayant conçu plusieurs années après leur chimiothérapie. En attendant des études humaines, et en fonction de l'âge des patientes et du type de traitement, il est conseillé aux patientes d'attendre au minimum 6 mois avant d'envisager une grossesse après une chimiothérapie, soit le temps nécessaire à une croissance folliculaire indépendante des gonadotrophines. Le délai nécessaire à la réalisation d'une cryopréservation ovocytaire ou ovarienne après une chimiothérapie est inconnue à ce jour.

### III. MODALITÉS DE PRÉSERVATION DE LA FERTILITÉ FÉMININE

#### III.1. Les techniques de protection de la fonction ovarienne

##### *III.1.a. La radioprotection*

La radioprotection ovarienne et utérine est difficile et peu efficace car ce sont des organes profonds. Nous ne l'envisagerons par conséquent pas dans cette revue.

##### *III.1.b. Suppression ovarienne par les agonistes de la GnRH (GnRHa)*

La suppression ovarienne à l'aide d'un GnRHa doit plutôt être envisagée comme une méthode de prévention « *in situ* » des altérations de la fonction gonadique par les traitements anticancéreux. Le rationnel du traitement par GnRHa en cours de chimiothérapie est de limiter le nombre de follicules en croissance en bloquant la sécrétion de FSH et LH, et de les soustraire ainsi aux effets gonadotoxiques des chimiothérapies [52]. Ce rationnel est faible compte tenu d'une part de la physiologie ovarienne, les follicules entrant en croissance indépendamment des gonadotrophines, et d'autre part des données épidémiologiques rapportant la possibilité d'une toxicité gonadique des traitements anticancéreux administrés avant la puberté, alors que l'axe gonadotrope est par définition non fonctionnel [53]. Cependant, en réduisant la perfusion ovarienne [54] ou en inhibant l'apoptose des cellules de la granulosa [55], l'ovaire pourrait bénéficier d'une certaine protection par les GnRHa. La suppression ovarienne reste donc à ce jour très controversée.

La plupart des études évaluant la suppression ovarienne par les GnRHa sont rétrospectives, incluant un faible nombre de patientes. Elles sont par ailleurs critiquables par le fait qu'elles comparent des groupes de patientes ayant des traitements ayant une toxicité ovarienne différente, sur une période de suivi relativement courte [56]. Des études observationnelles non contrôlées sur des populations hétérogènes de femmes traitées pour cancer du sein recevant des GnRHa pendant la chimiothérapie ont montré des taux d'aménorrhée en fin de suivi à 3 ans de 25 % et à 6 ans de 40 à 60 % [57]. Une étude récente portant sur des patientes atteintes de maladie de Hodgkin rétrospectivement séparées en 3 groupes en fonction de la gonadotoxicité du traitement a mis en évidence un avantage significatif en ce qui concerne l'évaluation de la réserve ovarienne post-traitement (évaluée par des

dosages de FSH sérique) chez les patientes ayant bénéficié d'une suppression ovarienne [58]. Deux études non randomisées et deux études non contrôlées sur de faibles effectifs (respectivement 120, 21, 125 et 5 patientes) suggèrent que cette pratique pourrait protéger la fertilité [56-61]. Dans ces études, le critère d'évaluation était le plus souvent l'aménorrhée. Dans une des seules études prospectives randomisées, 20 hommes et 8 femmes ayant reçu des GnRH $\alpha$  avant chimiothérapie pour maladie de Hodgkin ont bénéficié d'un suivi de leur fonction gonadotrope [62]. Aucune différence en termes d'aménorrhée n'a été constatée à 3 ans du traitement chez les patientes ayant reçu un GnRH $\alpha$  (4/8) comparativement au groupe contrôle (6/9). Cette étude concluait à l'absence d'effets bénéfiques évidents des GnRH $\alpha$  pour préserver la fonction gonadique des hommes ou de femmes recevant une chimiothérapie pour maladie de Hodgkin.

Plus récemment sont sortis les résultats de l'étude ZORO [63], un essai prospectif contrôlé, randomisé, multicentrique ayant inclus 60 patientes suivies pendant au moins 2 ans, qui n'a montré aucun bénéfice à l'adjonction d'un GnRH $\alpha$  (la goserelin) à visée de protection ovarienne en cours de chimiothérapie. Chez ces patientes de moins de 46 ans, alors même que la moyenne d'âge dans le groupe de femmes ayant reçu la goserelin était plus basse que comparativement au groupe contrôle (35 *versus* 38,5 ans), le temps d'aménorrhée était identique avec ou sans traitement par goserelin (6,8 mois (95 % IC, 5,2-8,4) *versus* 6,1 mois (95 % IC, 5,3-6,8)). D'autres essais randomisés [64, 65] ont évalué la triptoréline en tant que protecteur de la fonction ovarienne, les résultats sont contradictoires, l'un trouve un effet protecteur, l'autre ne trouve pas de différence significative. Deux autres études prospectives randomisées sont actuellement en cours, notamment aux États-Unis (« Goserelin in preventing ovarian failure in women receiving chemotherapy for breast cancer » ; Étude OPTION), portant sur 416 et 35 femmes respectivement.

Il faut par ailleurs souligner que cette stratégie thérapeutique est souvent mal tolérée (bouffées de chaleur, sécheresse vaginale) chez des femmes dont la qualité de vie est déjà altérée par la chimiothérapie. Par ailleurs, l'impact des GnRH $\alpha$  sur l'os est notable au-delà de 3 à 6 mois, ce qui pourra faire éventuellement discuter l'adjonction d'un traitement par biphosphonates si ce traitement devait être poursuivi, afin de prévenir une ostéoporose iatrogène.

Au total, les GnRH $\alpha$  n'ont donc à ce jour pas fait preuve de leur efficacité, et ne sont par conséquent pas recommandés.

### III.2. Cryopréservation embryonnaire

La cryopréservation embryonnaire, au stade de zygote ou d'embryons proprement dits, représente actuellement la technique de préservation de fertilité la mieux établie. La première grossesse issue d'un transfert d'embryons congelés (TEC) a été obtenue par Trounson et Mohr en 1983 [66]. Grâce à ces premiers résultats prometteurs et face aux besoins croissants des centres d'AMP, la congélation embryonnaire s'est rapidement développée et les procédures optimisées et simplifiées. Elle représente une activité primordiale et de routine dans un laboratoire de FIV pour le stockage des embryons surnuméraires [67].

Il existe actuellement deux techniques de congélation des embryons humains : la congélation lente et la vitrification. Au cours du processus de congélation, les cellules sont soumises à de nombreux stress, qu'ils soient mécaniques, thermiques ou chimiques, pouvant ultérieurement compromettre la fonction cellulaire. Les embryons peuvent être congelés au stade zygote (2 pronuclei), à J2 ou J3, ou au stade blastocyste (J5-J6).

#### *La congélation lente*

La congélation lente utilise une descente programmée de la température dans des congélateurs programmables après une exposition à des cryoprotecteurs qui conduisent à une déshydratation cellulaire et limitent la formation de cristaux intracellulaires. Elle utilise initialement de faibles concentrations de cryoprotecteurs (éthylène glycol (EG), propylène glycol (PROH), glycérol ou DMSO). L'embryon est exposé à des bains de concentrations croissantes en cryoprotecteur et sucrose puis monté dans une paillette haute sécurité et déposé dans l'appareil de congélation. La congélation, réalisée à l'aide d'un congélateur programmable permet un refroidissement d'environ 2 °C/min de la température ambiante à - 7 °C. À cette température, une cristallisation est induite manuellement à distance de l'ovocyte, par apposition sur les paillettes d'une barre métallique refroidie dans l'azote liquide, procédure communément appelée *seeding*. Par la suite, la descente en température est poursuivie à la vitesse de 0,3 °C/min jusqu'à - 35 °C. Pendant ce temps, la glace progresse, exclut les solutés et accroît la concentration des cryoprotecteurs. Le cryoprotecteur pénètre graduellement dans l'espace intracellulaire. Parallèlement, le sucrose induit une déshydratation des cellules embryonnaires et accroît la concentration intracellulaire en cryoprotecteur. À ce stade, deux protocoles s'opposent : la plongée directe dans l'azote liquide ou une

poursuite du refroidissement en automate jusqu'à  $-150\text{ °C}$  à une vitesse de  $33,3\text{ °C/min}$ . Dans ce dernier cas, la durée totale de congélation est d'environ deux heures. À la fin du programme, les paillettes sont stockées dans des bonbonnes d'azote liquide.

### *La vitrification*

La vitrification est une technique de refroidissement très rapide nécessitant de très hautes concentrations de cryoprotecteurs. Elle est autorisée en France depuis la loi du 8 juillet 2011. Elle conduit à un état vitreux, solide mais non cristallisé, ce qui prévient les effets toxiques et osmotiques associés aux gradients de concentration induits par la cristallisation. La vitrification peut être considérée comme une approche de congélation non équilibrée. Les paramètres qui gouvernent l'obtention de l'état vitreux sont la viscosité du milieu, obtenue grâce à des solutions très concentrées de cryoprotecteurs, la vitesse élevée de refroidissement par immersion directe dans l'azote liquide et le volume de l'échantillon qui doit être minimisé [68]. Les fortes concentrations de cryoprotecteurs nécessaires pour la vitrification peuvent être toxiques pour les cellules embryonnaires et entraîner leur fracture lors du refroidissement [69]. La durée d'exposition de l'ovocyte aux solutions cryoprotectrices est réduite pour limiter la toxicité.

Il existe deux types de système de vitrification, ouverts ou fermés. Les systèmes ouverts permettent un contact direct de la goutte contenant l'embryon avec l'azote liquide, ce qui soulève, en France, un problème de sécurité sanitaire. Les supports fermés permettent d'éviter le contact direct avec l'azote liquide sans diminution de la survie embryonnaire [69].

La congélation embryonnaire représente la technique de préservation de la fertilité féminine ayant les meilleurs taux de succès, avec des taux d'implantation de 10 à 20 % [69]. Il est cependant à noter que 20 à 30 % des embryons sont lysés dans les programmes de congélation lente. De très bons taux de grossesse, aux alentours de 50 %, sont également rapportés avec des blastocystes vitrifiés avec des taux d'implantation de 34,5 % [70]. Il a par ailleurs été rapporté des taux de grossesse similaires entre les blastocystes congelés selon la procédure lente ou après vitrification [71].

Outre son efficacité, cette technologie, pratiquée depuis plus de 20 ans, a fait la preuve de son innocuité, même si le recul chez des patientes traitées dans le cadre d'une préservation de fertilité pour cancer reste limité. De plus, elle est applicable par tous les centres pratiquant l'AMP et peut par conséquent être proposée à un grand nombre de patientes.

Cependant, la plupart des patientes atteintes de cancer n'ont le plus souvent pas le choix du recours à cette technique d'AMP bien validée. En effet, pour la majorité des cancers, la chimiothérapie est rapidement débutée après confirmation du diagnostic. De ce fait, la préparation et les traitements préalables au recueil ovocytaire en vue d'une fécondation *in vitro* avec congélation d'embryons ne sont le plus souvent pas réalisables. En effet, l'obtention d'ovocytes fécondables requiert une administration de gonadotrophines exogènes pendant 12 à 21 jours (cf. infra). De plus, cette stimulation ovarienne doit idéalement être débutée au début d'un cycle menstruel ou après une désensibilisation hypophysaire de 10 à 15 jours. Enfin, cette stimulation ovarienne ne peut se concevoir que chez des patientes pubères.

La cryopréservation embryonnaire nécessite par définition la présence d'un partenaire « stable » avec qui concevoir ces embryons, ce qui peut poser un certain nombre de problèmes éthiques chez des patientes ayant une relation dont l'ancienneté est limitée. Ainsi, pour pallier ces problèmes se sont développées plusieurs stratégies nouvelles de préservation de la fertilité.

### III.3. Cryopréservation ovocytaire

La cryopréservation ovocytaire représente une autre alternative à la préservation de la fertilité féminine. Depuis quelques années, la cryopréservation ovocytaire bénéficie d'un important intérêt, en raison de l'alternative qu'elle représente à la cryopréservation embryonnaire et ses problèmes légaux, moraux et religieux. Elle constitue une stratégie attractive dans le sens où elle ne nécessite pas de chirurgie, pas de partenaire, et fait appel à des protocoles de stimulation ovarienne (cf. infra) utilisés en FIV depuis plus de 20 ans. La première naissance après cryopréservation ovocytaire a été rapportée en 1986. Depuis 2004, plus de 1 000 enfants sont nés après utilisation de cette technique [72].

L'ovocyte mature, bloqué en métaphase II, est une cellule extrêmement fragile, en rapport avec sa grande taille, son contenu liquidien et son arrangement chromosomique. Dans l'ovocyte mature, les chromosomes en métaphase sont alignés sur le fuseau méiotique le long de la plaque équatoriale. Il est bien documenté que ce fuseau peut être facilement endommagé au cours des processus de congélation et de décongélation, ceci pouvant entraîner des anomalies chromosomiques [73, 74]. Par ailleurs, la formation de cristaux de glace intracellulaire au cours de la congélation peut être responsable d'une

lyse cellulaire [73, 74]. Outre le fuseau méiotique, le processus de cryopréservation peut également endommager les microfilaments essentiels d'une part à l'expulsion du second globule polaire et la migration des pronucléi lors de la fécondation et d'autre part lors de la cytokinèse. Enfin, un durcissement de la zone pellucide, une altération des granules corticaux faisant suite à ces procédures peuvent également affecter le processus normal de fécondation [75].

Les taux de dommages ovocytaires au cours de la congélation-décongélation diffèrent en fonction du stade de maturation des cellules germinales [76]. Les ovocytes congelés au stade de vésicule germinative (VG) survivent mieux que ceux congelés au stade ovocyte en métaphase II [77]. De plus, les ovocytes congelés au stade VG ont des taux plus bas d'anomalies du fuseau méiotique que ceux congelés en métaphase II [73]. Cependant, plusieurs études rapportent que ces ovocytes immatures seraient plus sensibles à la congélation que les ovocytes matures, probablement du fait d'une moindre stabilité membranaire et de spécificité du cytosquelette. La sensibilité à la congélation pourrait également être en rapport avec des altérations ou une interruption des projections des cellules du cumulus, qui sont fondamentales pour le contrôle de la communication entre ces cellules et l'ovocyte durant la maturation. Ainsi, bien que les ovocytes au stade VG aient de meilleurs taux de survie après décongélation avec de moindres altérations du fuseau méiotique, l'inefficacité des protocoles de maturation *in vitro* aboutit à un nombre final d'ovocytes matures utilisables inférieur à celui obtenu avec la congélation-décongélation d'ovocytes en métaphase II.

Comme pour les embryons, les ovocytes peuvent être congelés selon la technique de congélation lente ou de vitrification.

Chez l'humain, les taux de survie des ovocytes vitrifiés après décongélation ont été améliorés et les taux de fécondation approchent ceux des ovocytes frais [77]. En comparaison à des ovocytes frais, les taux de maturation ovocytaire, de fécondation et de développement embryonnaire sont similaires à ceux obtenus après vitrification d'ovocytes humains immatures [78].

Il semble par conséquent de plus en plus évident que les résultats de la vitrification ovocytaire dépassent ceux obtenus après congélation lente. Une équipe espagnole a récemment comparé les résultats de la FIV à partir d'ovocytes frais ou congelés selon les 2 méthodes classiquement utilisées. L'étude portait sur 3 524 ovocytes frais, 4 282 ovocytes vitrifiés et 361 ovocytes conservés par congélation lente. Les taux de fécondation, de clivage embryonnaire, d'embryons de top qualité, ainsi que les taux de grossesse étaient identiques avec ovocytes frais ou

vitrifiés. En revanche, les taux de survie ovocytaire, de fécondation, de clivage embryonnaire, ainsi que le nombre d'embryons top étaient inférieurs avec des ovocytes préservés en congélation comparativement à ceux obtenus avec des ovocytes vitrifiés [79]. De nombreux auteurs aboutissent à la même conclusion [80-83].

La tendance actuelle est donc clairement en faveur de la vitrification ovocytaire. La congélation lente est une technique qui est restée jusqu'à récemment maintenue en France du fait de l'interdiction de la vitrification. Depuis la loi du 8 juillet, la vitrification est autorisée en France, ce qui laisse à penser qu'elle va progressivement supplanter la congélation lente.

Les milliers d'enfants nés en bonne santé à travers le monde après cryopréservation ovocytaire prouvent le fonctionnement de la technique. Après décongélation des ovocytes aucune augmentation du nombre ou de la structure des chromosomes n'a été mise en évidence [84]. Par ailleurs, dans l'étude de Cobo *et al.*, l'incidence des anomalies en FISH des embryons issus d'ovocytes cryopréservés n'est pas différente de celle des embryons du groupe contrôle [84]. Une étude récente rapporte le suivi de 13 enfants obtenus après cryopréservation ovocytaire [85]. Comparativement à la population générale, il n'y avait pas de différence en termes de taux d'accouchement, de poids de naissance, de malformations congénitales et d'anomalies du caryotype. Borini *et al.* ne rapportent sur 60 enfants nés après cryopréservation ovocytaire que deux malformations dont une atrésie des choanes et un syndrome de Rubinstein Taydi [86].

La cryopréservation ovocytaire demeure toujours une procédure considérée expérimentale. Cependant, elle constitue pour de plus en plus d'équipes la modalité de choix en termes de préservation de la fertilité féminine. En effet, les résultats très encourageants, notamment après vitrification ovocytaire, ainsi que les données rassurantes sur les enfants nés de cette technique justifient son utilisation chez des femmes sans conjoint où ne désirant pas impliquer ce dernier dans la procédure de préservation de la fertilité. Elle permet ainsi de s'affranchir d'un certain nombre de problèmes éthiques relatifs à la cryopréservation embryonnaire.

Comme pour la cryopréservation embryonnaire, la nécessité d'une stimulation ovarienne, dont la pratique n'est pas simple voire contre-indiquée dans ces contextes plus ou moins urgents de pathologies oncologiques, explique l'émergence d'autres techniques, notamment la maturation ovocytaire *in vitro* et la cryopréservation de fragments ovariens.



#### IV. LES TECHNIQUES DE STIMULATION OVARIENNE UTILISÉES EN PRÉSERVATION DE LA FERTILITÉ FÉMININE

Les techniques de cryopréservation, qu'elles soient ovocytaires ou embryonnaires, requièrent classiquement une stimulation ovarienne par administration de gonadotrophines exogènes. Le type de stimulation dans les deux cas est une stimulation multifolliculaire, destinée à obtenir un maximum d'ovocytes fécondables. Les protocoles utilisés ne diffèrent pas de ceux classiquement utilisés en FIV, en dehors de tout contexte de cancer ou de préservation de fertilité. La stimulation ovarienne peut être réalisée avant, durant ou après le traitement anticancéreux. Dans tous les cas, on évaluera préalablement les paramètres de réserve ovarienne qui sont prédictifs de la réponse à la stimulation ovarienne. La situation idéale reste de stimuler avant toute chimiothérapie afin de diminuer les risques de mauvaise réponse et d'aneuploïdies [87].

Par ailleurs, un des principaux inconvénients réside dans le fait que ces stimulations multifolliculaires, qu'elles utilisent un protocole agoniste long ou antagoniste requièrent un délai de 2 à 3 semaines minimum avant l'obtention de follicules matures pouvant être ponctionnés. Or, ce délai n'est pas toujours compatible avec la prise en charge urgente de certains cancers. De plus, la stimulation ovarienne doit idéalement être débutée en phase folliculaire précoce ou après un minimum de 10 jours de prétraitement par agoniste du GnRH afin de s'assurer de la lutéolyse complète. Cela permet d'avoir une homogénéité de diamètre des follicules sélectionnables, indispensable à une réponse optimale à la stimulation par les gonadotrophines exogènes. Madrigano *et al.* ont rapporté que chez 23 patientes traitées en FIV dans le cadre d'une préservation de fertilité pour cancer du sein, un délai moyen de 31,3 jours (10-65 jours) était nécessaire avant le recueil ovocytaire [88]. Ainsi, pour limiter ce délai, certains ont décrit des protocoles de stimulation ovarienne débutés en phase lutéale [89]. L'objectif de ce protocole est de pouvoir aboutir au recueil ovocytaire en maximum 2 semaines. Ainsi, un antagoniste du GnRH est administré en phase lutéale afin de diminuer la LH sérique et initier la lutéolyse. Simultanément est débutée une stimulation ovarienne à l'aide de FSH recombinante, sans association à une activité LH afin de ne pas soutenir le corps jaune. Les 2 traitements sont administrés conjointement jusqu'à l'obtention de la maturité folliculaire. Avec ce protocole, le taux d'ovocytes recueillis et les taux de fécondation ne diffèrent pas significativement de celui obtenu avec des protocoles plus classiques [90].

La FIV pratiquée en cours de traitement anticancéreux ou après expose au risque de mauvaise réponse. Les effets de la chimiothérapie sur la fonction gonadique sont précoces et entraînent de fait une réduction de la réserve ovarienne, principal facteur pronostique de la réponse à la stimulation. Plusieurs études ont montré que l'efficacité de la FIV pratiquée en cours de chimiothérapie ou après guérison d'un cancer était considérablement diminuée, avec des taux élevés d'échec de recueil ovocytaire, une réduction du nombre et de la qualité des embryons obtenus [87, 89]. Il est par conséquent idéal de mettre en place une stimulation ovarienne en vue d'une préservation de la fertilité, avant toute chimiothérapie [87], même s'il a été montré que l'état d'hypercatabolisme en rapport avec la pathologie maligne peut entraîner une réduction de la réponse à la stimulation [43].

### ***Cas particulier des cancers estrogéno-dépendants***

Un des inconvénients de la stimulation ovarienne requise pour la FIV est représenté par l'atteinte de taux sériques d'estradiol supra-physiologiques, susceptibles d'être délétères en cas de cancer estrogéno-dépendant.

Si la FIV en cycle naturel (FIVnat), sans stimulation ovarienne préalable, constitue la solution idéale en cas de cancers estrogéno-dépendants, du fait des faibles concentrations sériques d'estradiol atteintes, elle ne permet l'obtention de taux d'implantation et de naissance faibles à partir d'un seul ovocyte ou embryon cryopréservé.

Récemment se sont développées de nouvelles modalités de stimulation de l'ovulation, permettant un recrutement multifolliculaire sans atteindre les taux supra-physiologiques d'estradiol sériques rencontrés dans les protocoles classiques de stimulation de l'ovulation pour FIV [91, 92-97]. Ces protocoles font appel à des molécules anti-estrogènes telles que le tamoxifène, ou aux inhibiteurs de l'aromatase.

Les patientes porteuses d'un cancer du sein, stimulées à partir du 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> jour du cycle avec une association de FSH exogène et de tamoxifène à la posologie de 40 à 60 mg/j, obtiennent en moyenne significativement plus d'ovocytes matures que les patientes en FIV en cycle naturel ( $1,6 \pm 0,3$  versus  $0,7 \pm 0,2$ ) [91]. Alors que le pic d'estradiol sérique est plus élevé après tamoxifène (442,4 pg/ml) qu'en FIVnat (278 pg/ml), l'effet antagoniste du tamoxifène sur les récepteurs aux estrogènes du tissu mammaire font que l'utilisation de ce protocole n'affecte vraisemblablement pas de manière négative le pronostic de ces patientes. En effet, de nombreuses femmes traitées par tamoxifène de façon chronique pendant 5 ans ont souvent des taux sériques d'estradiol élevés [93].

Une alternative est représentée par l'utilisation des inhibiteurs de l'aromatase, qui, en inhibant l'enzyme P450 aromatasase des cellules de la granulosa, empêche la conversion des androgènes produits par le follicule en estrogènes. Ainsi, en dépit de l'utilisation de gonadotrophines exogènes et d'un recrutement multi-folliculaire, les taux d'estradiol restent dans des limites physiologiques. Dans une étude comparant les résultats de 3 protocoles utilisant le tamoxifène seul ou l'association soit de tamoxifène, soit d'un inhibiteur de l'aromatase, le létrozole, à de la FSH exogène, il a été montré que le nombre d'ovocytes obtenus était significativement plus important avec cette dernière association comparativement au groupe tamoxifène seul ( $8,5 \pm 1,6$  versus  $1,5 \pm 0,3$ ). Cependant, et possiblement en rapport avec la faiblesse des effectifs, aucune différence statistique n'a été notée entre les groupes gonadotrophines + létrozole et gonadotrophines + tamoxifène ( $8,5 \pm 1,6$  versus  $5,1 \pm 1,1$ ) [96]. D'autre part, les pics d'estradiol atteints étaient significativement plus bas dans les groupes gonadotrophines + létrozole et tamoxifène seul, comparativement au groupe gonadotrophines + tamoxifène ( $380 \pm 60$  pg/ml,  $420 \pm 40$  pg/ml et  $1\ 200 \pm 300$  pg/ml, respectivement). Dans cette étude, à 2 ans de la stimulation, il n'a pas été constaté de taux de récurrence de cancer du sein supérieurs chez les patientes ayant reçu du létrozole comparativement à des patientes contrôles n'ayant pas été stimulées. En France, le tamoxifène et les inhibiteurs de l'aromatase n'ont pas l'AMM pour être utilisés dans le traitement de l'infertilité ou en vue d'une préservation de la fertilité.

## V. LA MATURATION OVOCYTAIRE *IN VITRO*

Le recueil des ovocytes immatures sans stimulation ovarienne préalable, et leur maturation *in vitro* (MIV) est une technologie classiquement utilisée en AMP dans le but de prévenir les complications iatrogènes de la stimulation ovarienne pour FIV. Elle consiste à obtenir la maturation nucléaire et cytoplasmique d'ovocytes recueillis à partir de follicules au stade antral précoce, visibles en échographie. La MIV présente les avantages de la stimulation ovarienne, notamment un nombre important d'ovocytes recueillis, sans nécessiter d'administration de gonadotrophines exogènes, prévenant ainsi le risque de syndrome d'hyperstimulation ovarienne (SHO). Plusieurs grossesses et naissances ont déjà été rapportées à travers le

monde chez des patientes infertiles [98-101]. Initialement, la MIV était principalement destinée aux femmes présentant un syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), ayant un risque de SHO sévère en cas de stimulation ovarienne.

Ainsi, la possibilité d'obtenir des ovocytes matures voire des embryons rend la MIV intéressante pour la préservation de la fertilité féminine.

### **V.1. Intérêt de la MIV dans la préservation de la fertilité féminine**

Outre le fait d'être applicable sans délai et donc en situation d'urgence, ainsi que chez des patientes porteuses de pathologies estrogéno-dépendantes telles que le carcinome mammaire ou le lupus érythémateux disséminé, la MIV possède deux autres propriétés fondamentales dans la préservation de la fertilité.

#### ***Une technique réalisable quelle que soit la phase du cycle***

Classiquement, le recueil ovocytaire en vue d'une MIV est pratiqué durant la phase folliculaire d'un cycle naturel, après administration d'hCG. Cependant des études réalisées au cours de la dernière décennie ont montré que des ovocytes recueillis au cours d'une césarienne, exposés à de fortes concentrations de progestérone, pouvaient être maturés *in vitro* et fécondés, avec obtention de grossesses et de naissances [102-104]. S'il a bien été montré que la lutéinisation précoce des follicules avant recueil des ovocytes matures en FIV conventionnelle était associée à de moins bons résultats [105], le rationnel de la ponction d'ovocytes immatures en phase lutéale repose sur le fait qu'il est possible que l'élévation des taux de LH et progestérones n'affecte pas les follicules antraux précoces contenant des ovocytes immatures. En effet, les cellules de la granulosa de ces follicules sont dépourvues de récepteurs à la LH, qui n'apparaîtront qu'en phase folliculaire tardive [106]. Par ailleurs, ni la présence de récepteurs à la LH ni celle de récepteurs à la progestérone n'a pu être montrée sur l'ovocyte au stade de vésicule germinative. Cependant, l'administration de doses supra-physiologiques d'activité LH sous forme d'hCG semble avoir un impact sur les follicules antraux précoces, par un mécanisme encore indéterminé. En effet, il a été démontré qu'un « priming » par hCG avant le recueil ovocytaire améliorerait les taux de maturation et de fécondation, ainsi que les taux de grossesse chez les patientes SOPK [107]. Ainsi, le recueil d'ovocytes

immatures en phase lutéale est réalisable lorsqu'aucune autre alternative n'existe. Récemment, il a été montré que les taux de maturation et le nombre d'ovocytes congelés après MIV étaient identiques, que le recueil ovocytaire ait été pratiqué en phase folliculaire ou lutéale [108].

### ***Combinaison des techniques de cryopréservation de fragments de corticale ovarienne et de MIV***

Un des intérêts majeurs de la MIV est de pouvoir s'associer à une ovariectomie pour cryopréservation de fragments ovariens. En effet, le but de la cryopréservation de tissu ovarien est de préserver des follicules primordiaux et primaires, représentant respectivement 70 à 90 % et 10 à 30 % des follicules ovariens [109, 110]. Ces deux classes folliculaires ont pour principale caractéristique d'être très résistantes au processus de congélation. Les follicules secondaires et antraux ne survivent pas ou peu à la congélation [111] probablement en raison d'une part de leur structure cellulaire complexe, conduisant à une mauvaise pénétration des cryoprotecteurs, et d'autre part à leur important contenu en eau, aboutissant à la formation de cristaux de glace.

Le rationnel de la combinaison des techniques de MIV et de cryopréservation de tissu ovarien est par conséquent d'avoir 2 techniques complémentaires à proposer aux patientes jeunes désireuses d'une préservation urgente de leur fertilité. Classiquement, le recueil ovocytaire est réalisé par ponction vaginale, avant que ne soit pratiquée l'ovariectomie. Cette dernière s'avèrera beaucoup plus aisée que si elle était pratiquée sur un ovaire préalablement stimulé, plus volumineux et richement vascularisé. Récemment, Huang *et al.* ont rapporté la possibilité du recueil d'ovocytes immatures *ex vivo*, au laboratoire de biologie de la reproduction, après ovariectomie [112]. Ainsi, sur les 4 patientes chez qui a été pratiquée cette technique, 3 ovocytes ont été obtenus en moyenne, avec des taux de maturation moyens de 79 %. Pour notre part, cette technique nous a permis d'obtenir 7 et 6 ovocytes immatures sur les 2 patientes chez qui ont été réalisées les ponctions *ex vivo* (données non publiées). Le principal inconvénient de cette technique est de devoir ponctionner des ovocytes sur un tissu ovarien suspendu dans du milieu de culture à 4 °C, température idéale pour la cryopréservation de cortex ovarien. Si ces ovocytes tendent à avoir de bons taux de maturation, il n'en est pas moins impossible de négliger les risques de perturbations méiotiques.

## V.2. Résultats de la MIV

La MIV constitue une technique désormais bien établie pour le traitement de l'infertilité, notamment chez les femmes porteuses d'un syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) [113, 114], avec plusieurs centaines d'enfants nés à ce jour. Des grossesses et des naissances ont par la suite été obtenues après MIV au cours d'un cycle naturel chez des patientes ayant des ovaires normaux [113]. À Clamart, la MIV a été instaurée en 2002, avec à ce jour des taux de grossesse par ponction de 26 % chez des femmes essentiellement OPK [115]. Dans certains cas sélectionnés, ces taux de grossesse peuvent atteindre 48 % [116], ce qui est comparable aux résultats en FIV conventionnelle dans de nombreux centres [117]. Il semble également acquis que les enfants nés après MIV ne présentent pas d'augmentation des taux d'anomalies fœtales ou néonatales comparativement aux enfants issus de FIV classique ou de grossesses naturelles [118]. Un poids de naissance moyen légèrement plus élevé dans le groupe des enfants nés après MIV est probablement attribuable aux facteurs maternels, notamment le SOPK, qui prédispose au diabète gestationnel et à la macrosomie.

Peu d'équipes utilisent encore la MIV dans l'indication de préservation de la fertilité, c'est pourquoi les résultats restent encore incertains. Huang *et al.* ont rapporté des cas de cryopréservation chez des patientes ayant un cancer du sein, permettant un bon taux de recueil ovocytaire avec des taux d'estradiol peu élevés au jour du recueil ( $270,6 \pm 90,5$  pmol/l) [119]. Une étude récente a par ailleurs démontré chez 38 femmes infertiles bien portantes que les ovocytes vitrifiés après stimulation ovarienne, comparativement à ceux vitrifiés après MIV, survivaient mieux à la décongélation ( $81,4 \pm 22,6$  % *versus*  $67,5 \pm 26,1$  %), avaient de meilleurs taux de fécondation ( $75,6 \pm 22,5$  % *versus*  $64,2 \pm 19,9$ %) et des taux cumulés d'embryons ( $38,4 \pm 22,3$  *versus*  $20,0 \pm 13,8$ ) plus élevés. En revanche, il n'existait pas de différence dans les taux d'implantation embryonnaire ( $19,1 \pm 25,8$  % *versus*  $9,6 \pm 24,1$  %), les taux de grossesse clinique ( $44,7$  % *versus*  $20,0$  %) et les taux de naissance par cycle ( $39,5$  % *versus*  $20,0$  %) [120].

Il manque encore une étude comparative des résultats de la MIV *versus* stimulation ovarienne utilisant les inhibiteurs de l'aromatase chez les patientes atteintes de cancer du sein.

Au total, la MIV reste une alternative intéressante en cas d'impossibilité de pratiquer une stimulation ovarienne, faute de temps ou en raison de l'estrogéno-dépendance de la pathologie sous-jacente, ce qui, dans notre expérience, représente un nombre de cas non négligeable.

## CONCLUSION

Depuis quelques années, les avancées thérapeutiques dans le domaine oncologique permettent à des femmes jeunes, atteintes de cancer, de penser à leur fertilité future. Par ailleurs, il est bien démontré que les femmes surmontent mieux d'un point de vue émotionnel le traitement du cancer lorsqu'elles savent qu'elles auront dans le futur une possibilité d'assouvir leur désir de maternité. Par conséquent, la préservation de fertilité se doit d'avancer afin de répondre à leur demande. La suppression ovarienne en cours de chimiothérapie n'a pas fait preuve de son efficacité. La vitrification embryonnaire et/ou ovocytaire après stimulation ovarienne constitue désormais la technique médicale de référence en matière d'oncofertilité. La MIV semble par ailleurs être une alternative intéressante à la stimulation ovarienne, permettant une cryopréservation embryonnaire et/ou ovocytaire sans stimulation ovarienne, en urgence, quelle que soit la phase du cycle. Elle est de fait particulièrement intéressante en cas de cancer hormono-dépendant. Toutes ces techniques restent dépendantes du statut folliculaire ovarien et ne pourront par conséquent pas être mises en place en cas d'insuffisance ovarienne importante. D'autre part, l'absence de garantie formelle d'obtention d'une grossesse avec ces techniques rend compte de l'importance d'informer les patientes sur le don d'ovocytes et l'adoption.

## Bibliographie

- [1] Ries LAG, Percy CL, Bunin GR. Introduction. In: Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR, eds. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United-States SEER Program 1975-1995 [NIH Pub N° 99-4649]. Bethesda, MD: National Cancer Institute 1999:1-15.
- [2] Partridge AH, Winer EP. Long-term complications of adjuvant chemotherapy for early stage breast cancer. *Breast Dis* 2004;21:55-64.
- [3] SIGN 76. The long-term follow-up of children treated for cancer. [www.sign.com](http://www.sign.com).
- [4] Falcone T. Preservation of fertility in the cancer patient. *MedGenMed* 2005;7:65.
- [5] Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 2006;24:2917-31.
- [6] American Society of Reproductive Medicine. Patient fact sheet. <http://www.asrm.org/Patients/FactSheets/Cancer.pdf>. Accessed online 17 September 2007.
- [7] Roberts JE, Oktay K. Fertility preservation: a comprehensive approach to the young woman with cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;34:57-9.
- [8] Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biol Reprod* 1994 Mar;50:653-63.
- [9] Simpson JL. Genetic programming in ovarian development and oogenesis. In: Lobo RA, Kelsey J, Marcus R, eds. *Menopause: biology and pathobiology*. San Diego, Calif.: Academic Press 2000:77-94.
- [10] Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004;428(6979):145-50.
- [11] Whitehead E, Shalet SM, Blackledge G, Todd I, Crowther D, Beardwell CG. The effect of combination chemotherapy on ovarian function in women treated for Hodgkin's disease. *Cancer* 1983;52:988-93.
- [12] Wallace WH, Shalet SM, Hendry JH, Morris-Jones PH, Gattamaneni HR. Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: the radiosensitivity of the human oocyte. *Br J Radiol* 1989;62:995-8.
- [13] Larsen EC, Müller J, Schmiegelow K, Rehnitz C, Andersen AN. Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5307-14.
- [14] Scheffer GJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, Habbema JD, Looman CW, Te Velde ER. Quantitative transvaginal two- and three-dimensional sonography of the ovaries: reproducibility of antral follicle counts. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002;20:270-5.
- [15] Broekmans FJ, Faddy MJ, Scheffer G, te Velde ER. Antral follicle counts are related to age at natural fertility loss and age at menopause. *Menopause* 2004;11:607-14.
- [16] Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in *in vitro* fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002;77:328-36.
- [17] Nahum R, Shifren JL, Chang Y, Leykin L, Isaacson K, Toth TL. Antral follicle assessment as a tool for predicting outcome in IVF—is it a better predictor than age and FSH? *J Assist Reprod Genet* 2001;18:151-5.
- [18] Grynberg M, Feyereisen E, Scheffer JB, Koutroubis P, Frydman R, Fanchin R. Early follicle development alters the relationship between antral follicle counts and inhibin B and follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3. *Fertil Steril* 2008 Dec 3.
- [19] De Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002;77:357-62.
- [20] Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003;18:323-7.
- [21] Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM. Early follicular serum



müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2002; 77:468-71.

[22] Van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, Themmen AP. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002;17:3065-71.

[23] La Marca A, Stabile G, Artenisio AC, Volpe A. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 2006;21:3103-7.

[24] La Marca A, Volpe A. The Anti-Mullerian hormone and ovarian cancer. *Hum Reprod Update* 2007;13:265-73.

[25] Bath LE, Tydeman G, Critchley HO, Anderson RA, Baird DT, Wallace WH. Spontaneous conception in a young woman who had ovarian cortical tissue cryopreserved before chemotherapy and radiotherapy for a Ewing's sarcoma of the pelvis: case report. *Hum Reprod* 2004;19:2569-72.

[26] Sanders JE, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner CD, Deeg HJ, Doney K, Storb R, Sullivan K, Witherspoon R, Appelbaum FR. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:3045-52.

[27] Bath LE, Critchley HO, Chambers SE, Anderson RA, Kelnar CJ, Wallace WH. Ovarian and uterine characteristics after total body irradiation in childhood and adolescence: response to sex steroid replacement. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106:1265-72.

[28] Wallace WH, Thomson AB, Kelsey TW. The radiosensitivity of the human oocyte. *Hum Reprod* 2003;18:117-21.

[29] Wallace WH, Thomson AB, Saran F, Kelsey TW. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:738-44.

[30] Critchley HO, Wallace WH, Shalet SM, Mamtora H, Higginson J, Anderson DC. Abdominal irradiation in childhood; the potential for pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:392-4.

[31] Mackie EJ, Radford M, Shalet SM. Gonadal function following chemotherapy for childhood Hodgkin's disease. *Med Pediatr Oncol* 1996;27:74-8.

[32] Wallace WH, Shalet SM, Lendon M, Morris-Jones PH. Male fertility in long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Int J Androl* 1991;14:312-9.

[33] Thomson AB, Campbell AJ, Irvine DC, Anderson RA, Kelnar CJ, Wallace WH. Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: a case-control study. *Lancet* 2002;360:361-7.

[34] Chapman RM, Sutcliffe SB, Malpas JS. Cytotoxic-induced ovarian failure in women with Hodgkin's disease. *JAMA* 1979;242:1877-1881.

[35] Warne GL, Fairly KF, Hobbs JB *et al*. Cyclophosphamide-induced ovarian failure. *N Engl J Med* 1973;289:1159-1162.

[36] Koyama H, Wada T, Nishizawa Y *et al*. Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. *Cancer* 1977;39:1403-1409.

[37] Byrne J, Kessler LG, Devesa SS. The prevalence of cancer among adults in the United States: 1987. *Cancer* 1992;69:2154-9.

[38] Larsen EC, Schmiegelow K, Rechnitzer C, Loft A, Müller J, Andersen AN. Radiotherapy at a young age reduces uterine volume of childhood cancer survivors. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:96-102.

[39] Schilsky RL, Sherins RJ, Hubbard SM, Wesley MN, Young RC, DeVita VT. Long-term follow-up of ovarian function in women treated with MOPP chemotherapy for Hodgkin's disease. *Am J Med* 1981;71:552-6.

[40] Clark ST, Radford JA, Crowther D, Swindell R, Shalet SM. Gonadal function following chemotherapy for Hodgkin's disease: a comparative study of MVPP and a seven-drug hybrid regimen. *J Clin Oncol* 1995;13:134-9.

[41] Rueffer U, Josting A, Franklin J, May M, Sieber M, Breuer K, Engert A, Diehl V; German Hodgkin's Lymphoma Study Group. Non-Hodgkin's lymphoma after primary Hodgkin's disease in the German Hodgkin's Lymphoma Study Group: incidence, treatment, and prognosis. *J Clin Oncol* 2001;19:2026-32.

[42] Magelssen H, Brydoy M, Fosså SD. The effects of cancer and cancer treatments on male reproductive function. *Nat Clin Pract Urol* 2006;3:312-22.

[43] Quintero RB, Helmer A, Huang JQ, Westphal LM. Ovarian stimulation for fertility preservation in patients with cancer. *Fertil Steril* 2010 Feb;93(3):865-8. Epub 2008 Nov 14.

- [44] Schmidt KL, Andersen CY, Loft A, Byskov AG, Ernst E, Andersen AN. Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. *Hum Reprod* 2005;20:3539-46.
- [45] Anderson RA, Themmen AP, Al-Qahtani A, Groome NP, Cameron DA. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. *Hum Reprod* 2006;21:2583-92.
- [46] Van Beek RD, van den Heuvel-Eibrink MM, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Hakvoort-Cammel FG, van den Bos C, van den Berg H, Pieters R, de Muinck Keizer-Schrama SM. Anti-Mullerian hormone is a sensitive serum marker for gonadal function in women treated for Hodgkin's lymphoma during childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3869-74.
- [47] Giuseppe L, Attilio G, Edoardo DN, Loredana G, Cristina L, Vincenzo L. Ovarian function after cancer treatment in young women affected by Hodgkin disease (HD). *Hematology* 2007;12:141-7.
- [48] Lie Fong S, Lugtenburg PJ, Schipper I, Themmen AP, de Jong FH, Sonneveld P, Laven JS. Anti-müllerian hormone as a marker of ovarian function in women after chemotherapy and radiotherapy for haematological malignancies. *Hum Reprod* 2008;23:674-8.
- [49] 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* 2001;16:632-7.
- [50] Hawkins MM. Pregnancy outcome and offspring after childhood cancer. *BMJ* 1994;309:1034.
- [51] Sanders JE, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner CD, Deeg HJ, Doney K, Storb R, Sullivan K, Witherspoon R, Appelbaum FR. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:3045-52.
- [52] Ataya K, Pydyn E, Ramahi-Ataya A, Orton CG. Is radiation-induced ovarian failure in rhesus monkeys preventable by luteinizing hormone-releasing hormone agonists? Preliminary observations. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:790-5.
- [53] Brougham MF, Wallace WH. Subfertility in children and young people treated for solid and haematological malignancies. *Br J Haematol* 2005;131:143-55.
- [54] Engmann L, Sladkevicius P, Agrawal R, Bekir JS, Campbell S, Tan SL. Value of ovarian stromal blood flow velocity measurement after pituitary suppression in the prediction of ovarian responsiveness and outcome of *in vitro* fertilization treatment. *Fertil Steril* 1999;71:22-9.
- [55] Meduri G, Charnaux N, Spyrtatos F, Hacene K, Loosfelt H, Milgrom E. Luteinizing hormone receptor status and clinical, pathologic, and prognostic features in patients with breast carcinomas. *Cancer* 2003;97:1810-6.
- [56] Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 2004;10:251-66.
- [57] Recchia F, Saggio G, Amiconi G, Di Blasio A, Cesta A, Candeloro G, Rea S. Gonadotropin-releasing hormone analogues added to adjuvant chemotherapy protect ovarian function and improve clinical outcomes in young women with early breast carcinoma. *Cancer* 2006;106:514-23.
- [58] Huser M, Crha I, Ventruba P, Hudecek R, Zakova J, Smardova L, Kral Z, Jarkovsky J. Prevention of ovarian function damage by a GnRH analogue during chemotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *Hum Reprod* 2008;23:863-8.
- [59] Franke HR, Smit WM, Vermes I. Gonadal protection by a gonadotropin-releasing hormone agonist depot in young women with Hodgkin's disease undergoing chemotherapy. *Gynecol Endocrinol* 2005;20:274-8.
- [60] Blumenfeld Z. Treatment with gonadotropin-releasing hormone agonists and prevention of multiple gestations in lupus or antiphospholipid syndrome patients undergoing *in vitro* fertilization: comment on the article by Guballa *et al.* *Arthritis Rheum* 2002;46:2542.
- [61] Pereyra Pacheco B, Mendez Ribas JM, Milone G, Fernandez I, Kvicala R, Mila T, Di Noto A, Contreras Ortiz O, Pavlovsky S. Use of GnRH analogs for functional protection of the ovary and preservation of fertility during cancer treatment in adolescents: a preliminary report. *Gynecol Oncol* 2001;81:391-7.
- [62] Waxman JH, Sandow J, Man A, Barnett MJ, Hendry WF, Besser GM, Oliver RT, Magill PJ. The first clinical use of depot buserelin for

advanced prostatic carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986;18:174-5.

[63] Gerber B, von Minckwitz G, Stehle H *et al.* Effect of luteinizing hormone-releasing hormone agonist on ovarian function after modern adjuvant breast cancer chemotherapy: the GBG 37 ZORO Study. *J Clin Oncol* 2011.

[64] Del Mastro L, Boni L, Michelotti A *et al.* *J Clin Oncol* 2010;28:S15 (abstract 528).

[65] Ismail-Khan R. *J Clin Oncol* 2008;26:S12 (abstract 524).

[66] Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;305:707-9.

[67] Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24:2917-31.

[68] Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 2007;67:81-9.

[69] Paris F, Perez GI, Morita Y, Tilly JL, Fuks Z, Kolesnick RN. Comment bloquer l'apoptose des ovocytes ? *Médecine Sciences* 2001;17:230-231.

[70] Vanderzwalmen P, Zech N, Greindl AJ, Ectors F, Lejeune B. Cryopreservation of human embryos by vitrification. *Gynecol Obstet Fertil* 2006;34:760-9.

[71] Urman B, Balaban B, Yakin K. Impact of fresh-cycle variables on the implantation potential of cryopreserved-thawed human embryos. *Fertil Steril* 2007;87:310-5.

[72] Noyes N, Porcu E, Borini A. Over 900 oocyte-cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reprod Biomed Online* 2009;18:769-776.

[73] Shaw JM, Cox SL, Trounson AO, Jenkin G. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. *Mol Cell Endocrinol* 2000;161:103-10.

[74] Baka SG, Toth TL, Veeck LL, Jones HW Jr, Muasher SJ, Lanzendorf SE. Evaluation of the spindle apparatus of *in vitro* matured human oocytes following cryopreservation. *Hum Reprod* 1995;10:1816-20.

[75] Matson PL, Graefling J, Junk SM, Yovich JL, Edirisinghe WR. Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate

effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an *in vitro* fertilization programme. *Hum Reprod* 1997;12:1550-3.

[76] Luvoni GC, Pellizzari P. Embryo development *in vitro* of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. *Theriogenology* 2000;53:1529-40.

[77] Boiso I, Marti M, Santalo J, Ponsa M, Barri PN, Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod* 2002;17(7):1885-91.

[78] Yoon TK, Chung HM, Lim JM, Han SY, Ko JJ, Cha KY. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated *in vitro* fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 2000;74:180-1.

[79] Wu J, Zhang L, Wang X. *In vitro* maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction* 2001;121:389-93.

[80] Luvoni GC, Pellizzari P. Embryo development *in vitro* of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. *Theriogenology* 2000;53:1529-40.

[81] Boiso I, Marti M, Santalo J, Ponsa M, Barri PN, Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod* 2002;17:1885-91.

[82] Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 2007;67:81-9.

[83] Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 2011;96:277-5

[84] Cobo A, Rubio C, Gerli S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J. Use of fluorescence *in situ* hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil Steril* 2001;75:354-60.

[85] Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti PM, Venturoli S, Flamigni C. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169:33-7.

[86] Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2006;86:70-80.

- [87] Dolmans MM, Demylle D, Martinez-Madrid B, Donnez J. Efficacy of *in vitro* fertilization after chemotherapy. *Fertil Steril* 2005;83:897-901.
- [88] Madrigano A, Westphal L, Wapnir I. Egg retrieval with cryopreservation does not delay breast cancer treatment. *Am J Surg* 2007;194:477-81.
- [89] Ginsburg ES, Yanushpolsky EH, Jackson KV. *In vitro* fertilization for cancer patients and survivors. *Fertil Steril* 2001;75:705-10.
- [90] Von Wolff M, Thaler CJ, Frambach T, Zeeb C, Lawrenz B, Popovici RM, Strowitzki T. Ovarian stimulation to cryopreserve fertilized oocytes in cancer patients can be started in the luteal phase. *Fertil Steril* 2009;92:1360-5.
- [91] Oktay K, Buyuk E, Rosenwaks Z, Rucinski J. A technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *Fertil Steril* 2003;80:193-8.
- [92] Steiner AZ, Terplan M, Paulson RJ. Comparison of tamoxifen and clomiphene citrate for ovulation induction: a meta-analysis. *Hum Reprod* 2005;20:1511-5.
- [93] Klijn JG, Beex LV, Mauriac L, van Zijl JA, Veyret C, Wildiers J, Jassem J, Piccart M, Burghouts J, Becquart D, Seynaeve C, Mignolet F, Duchateau L. Combined treatment with buserelin and tamoxifen in premenopausal metastatic breast cancer: a randomized study. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:903-11.
- [94] Pfister CU, Martoni A, Zamagni C, Lelli G, De Braud F, Souppart C, Duval M, Hornberger U. Effect of age and single *versus* multiple dose pharmacokinetics of letrozole (Femara) in breast cancer patients. *Biopharm Drug Dispos* 2001;22:191-7.
- [95] Casper RF. Aromatase inhibitors in ovarian stimulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;106(1-5):71-5.
- [96] Oktay K. Further evidence on the safety and success of ovarian stimulation with letrozole and tamoxifen in breast cancer patients undergoing *in vitro* fertilization to cryopreserve their embryos for fertility preservation. *J Clin Oncol* 2005;23:3858-9.
- [97] Prichard RS, Hill AD, Dijkstra B, McDermott EW, O'Higgins NJ. The prevention of breast cancer. *Br J Surg* 2003;90:772-83.
- [98] Trounson A, Wood C, Kausche A. *In vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994;62:353-62.
- [99] Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, Fanchin R, Chian RC, Tachdjian G, Frydman R, Frydman N. *In vitro* oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Hum Reprod* 2005;20:420-4.
- [100] Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S. *In vitro* maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Hum Reprod* 1999;14:1847-51.
- [101] Chian RC, Güleki B, Buckett WM, Tan SL. Priming with human chorionic gonadotropin before retrieval of immature oocytes in women with infertility due to the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1999;341:1624-1626.
- [102] Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from non-stimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991;55:109-13.
- [103] Hwang JL, Lin YH, Tsai YL. Pregnancy after immature oocyte donation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1997;68:1139-40.
- [104] Hwang JL, Lin YH, Tsai YL. *In vitro* maturation and fertilization of immature oocytes: a comparative study of fertilization techniques. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:39-43.
- [105] Bosch E, Valencia I, Escudero E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Premature luteinization during gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles and its relationship with *in vitro* fertilization outcome. *Fertil Steril* 2003;80:1444-9.
- [106] Yang SH, Son WY, Yoon SH, Ko Y, Lim JH. Correlation between *in vitro* maturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in HCG-primed IVM cycles. *Hum Reprod* 2005;20:2097-103.
- [107] Chian RC, Güleki B, Buckett WM, Tan SL. Priming with human chorionic gonadotropin before retrieval of immature oocytes in women with infertility due to the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1999;341:1624-1626. Erratum in: *N Engl J Med* 2000;342:224.

[108] Maman E, Meirow 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.

[109] Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1986;1:81-7.

[110] Lass A, Silye R, Abrams DC, Krausz T, Hovatta O, Margara R, Winston RM. Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve. *Hum Reprod* 1997;12:1028-31.

[111] Gosden RG. Gonadal tissue cryopreservation and transplantation. *Reprod Biomed Online* 2002;4(1):64-7.

[112] Huang JY, Tulandi T, Holzer H, Tan SL, Chian RC. 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.

[113] Chian RC. *In vitro* maturation of immature oocytes for infertile women with PCOS. *Reprod Biomed Online* 2004;8:547-52.

[114] Edwards RG. Foreword. In: Tan SL, Chian RC, Buckett WM, eds. *In vitro* maturation of human oocytes: basic science to clinical application. London: Informa 2006:xv-xx.

[115] Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, Fanchin R, Chian RC, Tachdjian G, Frydman R, Frydman N. *In vitro* oocyte maturation for the treatment of

infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Hum Reprod* 2005;20:420-4.

[116] Son WY, Lee SY, Yoon SH, Lim JH. 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.

[117] European IVF-monitoring programme (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Andersen AN, Gianaroli L, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe, 2002. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2006;21:1680-97.

[118] Buckett WM, Chian RC, Holzer H, Dean N, Usher R, Tan SL. Obstetric outcomes and congenital abnormalities after *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, and intracytoplasmic sperm injection. *Obstet Gynecol* 2007; 110:885-91.

[119] Huang JY, Tulandi T, Holzer H, Tan SL, Chian RC. 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.

[120] Chian RC, Huang JY, Gilbert L, Son WY, Holzer H, Cui SJ, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Obstetric outcomes following vitrification of *in vitro* and *in vivo* matured oocytes. *Fertil Steril* 2009;91:2391-8.

