

Préservation de la fertilité féminine - Les techniques futures

S. MIRALLIÉ *, T. FRÉOUR, P. BARRIÈRE
(Nantes)

Résumé

La préservation de la fertilité chez les patients devant bénéficier d'un traitement potentiellement stérilisant est un élément très important de leur prise en charge. Nous aborderons ici les différentes techniques pouvant être proposées aux jeunes femmes ou petites filles dont la fertilité future est menacée (par un traitement anticancéreux ou non) que sont la congélation d'embryons, la congélation ovocytaire, la congélation de tissu ovarien et ses différentes modalités de réutilisation, les approches pharmacologiques et la transposition ovarienne.

Mots clés : préservation fertilité, congélation, vitrification, embryon, ovocyte, tissu ovarien

* CHU de Nantes - Service de médecine et biologie de la reproduction - 38 boulevard Jean Monnet - 44093 Nantes cedex 1

Correspondance : sophie.mirallie@chu-nantes.fr

Déclaration publique d'intérêt

Je soussignée, Sophie Mirallié, 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

La préservation de la fertilité chez les patients devant bénéficier d'un traitement potentiellement stérilisant (dans le cadre de la prise en charge d'une pathologie cancéreuse ou non) est un sujet d'actualité. Nous aborderons ici les techniques pouvant être proposées chez la femme et la petite fille.

En effet, l'augmentation des taux de survie après cancer et l'intérêt croissant pour la qualité de vie après traitement anticancéreux, associés aux progrès des techniques de l'assistance médicale à la procréation, ont rendu la réflexion sur la préservation de la fertilité un élément très important de la prise en charge initiale multidisciplinaire des patientes concernées.

Il est estimé que grâce à l'efficacité des traitements actuels (chimiothérapie, radiothérapie, greffe de moelle), 90 % des filles atteintes d'un cancer dans l'enfance vont survivre [1]. À l'âge adulte ces jeunes femmes risquent d'être confrontées à des problèmes de fertilité en raison d'une insuffisance ovarienne prématurée, conséquence de leur traitement [2]. Dans le cas de la greffe de moelle (chez l'enfant ou l'adulte), le risque d'insuffisance ovarienne a été évalué entre 92 % [3] et 100 % [4] selon les études. Une étude rétrospective sur 37 362 patientes ayant bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques a montré que 0,6 % seulement avaient conçu après auto- ou allogreffe [5].

Toutes les patientes (petites filles (et leurs responsables légaux) et femmes en âge de procréer) dont la fertilité future est menacée par la mise en place de traitements gonadotoxiques doivent pouvoir accéder à une information objective sur les possibilités de préservation de celle-ci et pouvoir demander à en bénéficier rapidement dès l'établissement du diagnostic pour optimiser les conditions de prise en charge [6].

Une étude multicentrique internationale [7] rapporte l'analyse des choix et de la prise en charge effective en résultant chez 1 280 patientes (âgées de 15 à 40 ans, moyenne 27,8 ans) dont 86,1 % sans enfant, adressées en consultation de préservation de fertilité avant la mise en place de leur traitement cytotoxique. 84,3 % des patientes ont choisi de recourir à au moins une technique de préservation de la fertilité.

Nous aborderons successivement les différentes techniques pouvant être proposées qui sont la congélation d'embryons, la congélation ovocytaire, la congélation de tissu ovarien et ses différentes modalités de réutilisation, les approches pharmacologiques et la transposition ovarienne.

I. CONGÉLATION EMBRYONNAIRE

La conservation embryonnaire est la seule méthode reconnue de préservation de la fertilité selon le Comité éthique de la Société américaine de médecine de la reproduction [8]. Cette technique nécessite que la patiente soit pubère, qu'elle ait un conjoint et qu'elle puisse bénéficier d'un cycle de stimulation ovarienne sans interférer avec le calendrier de la prise en charge oncologique [9].

Cette technique est utilisée quotidiennement en assistance médicale à la procréation depuis plus de 25 ans pour permettre une stratégie de transfert embryonnaire réduisant le risque de grossesse multiple, et pour augmenter les chances de grossesse en permettant la conservation des embryons surnuméraires obtenus en fécondation *in vitro* (FIV) depuis la première naissance après transfert d'embryons congelés en 1984 [10]. Une étude européenne sur plus de 97 633 transferts d'embryons décongelés met en évidence des taux de grossesse clinique de 19 % et des taux d'accouchement de 13,4 % par décongélation [11].

Comme toute FIV, elle nécessite une stimulation multi-folliculaire de l'ovulation suivie d'une ponction ovocytaire, ce qui peut imposer un délai dans la mise en place du traitement oncologique en fonction du cycle de la patiente. Des protocoles de stimulation initiés en phase lutéale avec une lutéolyse par antagonistes ont été développés afin de diminuer le temps nécessaire à la mise en place de la conservation embryonnaire [12].

Par ailleurs la stimulation entraîne une augmentation importante des taux d'œstradiol, ce qui a constitué un frein à ce type de prise en

charge dans les cancers hormono-dépendants jusqu'il y a quelques années. L'équipe d'Oktay a proposé de prendre en charge des patientes atteintes de cancer du sein en réalisant la stimulation de l'ovulation avec du tamoxifène [13] ou des inhibiteurs de l'aromatase [14], en association avec des gonadotrophines [15], sans décaler la prise en charge chimiothérapique des patientes réalisée généralement 3 à 6 semaines après la chirurgie [16, 17]. Il est à noter que ces molécules n'ont pas actuellement l'AMM pour la stimulation de l'ovulation en France. D'autres équipes proposent cette prise en charge avec des stimulations classiques de l'ovulation dans ce type d'indication [18, 19, 20].

Contrairement à ce qui est observé sur les paramètres du sperme lors des conservations avant chimiothérapie, il n'est pas mis en évidence d'effets délétères de la pathologie (avec une stimulation classique) sur les résultats des tentatives de FIV par rapport à une population-témoin prise en charge en FIV [18-20]. Une équipe rapporte néanmoins une durée de stimulation plus longue et avec des doses de gonadotrophines plus élevées chez les patientes atteintes d'un cancer [21].

Comme dans toute prise en charge en AMP les résultats sont moins bons chez les patientes âgées de 36 à 40 ans pour lesquelles moins d'ovocytes et moins d'embryons peuvent être conservés, en raison de réponses plus faibles à la stimulation [19]. Dans cette étude, le taux de naissance moyen calculé attendu après un transfert de 2 embryons congelés au stade pronuclei est de 15 %. Le nombre possible de transferts d'embryons congelés passant de 3,5 dans le groupe de patientes âgées de 18 à 25 ans à 2 dans le groupe de femmes âgées de 36 à 40 ans, ce qui limite l'efficacité possible de la technique dans cette tranche d'âge.

Toute amélioration des résultats des techniques de congélation embryonnaire en termes de grossesse par embryon décongelé permettra d'optimiser la préservation de la fertilité des patientes. Une méta-analyse récente [22] à partir d'études prospectives randomisées avec groupe contrôle compare la vitrification et la congélation lente d'embryons. La vitrification est supérieure en termes de taux d'implantation, de taux de grossesse évolutive et de naissance vivante par rapport à la congélation lente. Ceci confirme l'observation de taux de survie embryonnaire supérieurs après vitrification d'une méta-analyse antérieure [23].

II. CONGÉLATION OVOCYTAIRE

La congélation ovocytaire peut être proposée à des jeunes femmes célibataires et obéit aux mêmes contraintes de stimulation de l'ovulation que la conservation embryonnaire lorsqu'il s'agit d'une conservation d'ovocytes matures.

II.1. Congélation d'ovocytes matures

La première naissance après congélation d'ovocytes matures (en métaphase II) a été rapportée en 1986 [24]. L'observation d'anomalies (liées à l'exposition aux cryoprotecteurs et aux étapes de congélation/décongélation), comme la désorganisation du fuseau méiotique [25] et une réaction prématurée des granules corticaux [26, 27], associées à des taux faibles de fécondation et à des résultats médiocres par rapport à ceux obtenus avec la congélation embryonnaire ont conduit à un désintérêt relatif pour cette technique pendant plusieurs années.

De nouvelles naissances ont été observées en 1997 par congélation lente [28] et en 1999 par vitrification [29], notamment grâce à l'ICSI (injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes) qui permet de s'affranchir du problème de durcissement pellucidaire [30]. Concernant les modifications fusoriales, de nombreuses études ont montré que le fuseau se reforme après la décongélation [31-34] et les embryons obtenus ne présentent pas plus d'aneuploidies [35, 36].

Depuis les améliorations apportées aux protocoles (tant de congélation lente [37, 38] que de vitrification [32, 39, 40] ovocytaire) des résultats comparables en termes de grossesse sont obtenus avec des ovocytes frais ou décongelés dans le cadre du don d'ovocytes [41] ou non [42, 43].

Les techniques de vitrification mettent en évidence des taux de survie après décongélation et des taux de grossesse supérieurs à ceux obtenus en congélation lente [44, 45] et des résultats équivalents à ceux obtenus avec des ovocytes frais [41].

Des séries de plus en plus importantes d'enfants nés après cryopréservation ovocytaire ne mettent pas en évidence d'anomalies chez ceux-ci [46, 47], ce qui peut amener à considérer cette technique comme n'étant plus expérimentale [48-51].

II.2. Congélation d'ovocytes immatures

Un des intérêts théoriques de la congélation de l'ovocyte immature, au stade prophase I avec une vésicule germinative, est de s'affranchir des anomalies fusoriales observées lors de la congélation d'ovocytes matures [52]. Cette technique présente aussi l'avantage de pouvoir recueillir des ovocytes en cycle spontané sans recourir à une stimulation importante [53].

Même si les taux de survie ovocytaire ont augmenté, les limites liées à la conservation d'ovocytes immatures sont les faibles résultats en termes de maturation post-décongélation, de taux de fécondation et de développement embryonnaire [54-56] avec les protocoles de congélation lente.

L'unique naissance après congélation lente d'ovocytes immatures a été rapportée en 1998 [57] puis les techniques précitées de congélation d'ovocytes matures ont été développées avec succès. Au regard des bons résultats obtenus en vitrifiant les ovocytes matures, une étude récente a comparé la vitrification au stade vésicule germinative avec la vitrification après maturation *in vitro* [58]. Si la survie ovocytaire est équivalente dans les deux techniques, en revanche le taux de maturation ovocytaire est très inférieur pour les ovocytes vitrifiés avant maturation ainsi que le pourcentage d'embryons de bonne qualité au 3^e jour de développement.

Quelle que soit la technique de congélation, le potentiel de maturation ovocytaire est réduit, ce qui incite à la conservation après maturation ovocytaire.

II.3. Maturation *in vitro* des ovocytes avant conservation

Une stratégie de préservation de la fertilité est le recueil d'ovocytes immatures sans stimulation, suivi d'une maturation *in vitro* puis d'une vitrification au stade métaphase II (ou au stade embryonnaire après FIV si la patiente a un conjoint) [59-61].

Ces techniques de maturation *in vitro* (MIV) dans le cadre de la prise en charge de femmes infertiles ont permis la naissance de plus de 2 000 enfants en bonne santé et même si les taux de grossesse observés sont plus faibles qu'en FIV classique, elles ont une place dans la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer [49].

Le recueil ovocytaire peut être réalisé à n'importe quel moment du cycle sans affecter la qualité et le taux de maturation des ovocytes [61]. Le traitement consiste en l'administration de 10 000 UI de

gonadotrophine chorionique (hCG) 36 heures avant la ponction ovocytaire suivie d'une maturation *in vitro* pendant 24 à 48 heures. Cette stratégie permet une prise en charge assez rapide puisque les auteurs décrivent en moyenne une ponction 13 jours après la première consultation. Une équipe [49] rapporte une série de 115 patientes atteintes d'un cancer ayant bénéficié soit d'une préservation embryonnaire, soit d'une préservation ovocytaire après MIV, avec en moyenne 4 embryons et 6 ovocytes conservés par patiente. Le nombre d'ovocytes conservés par patiente est de 7 en moyenne dans une autre étude sur 18 patientes atteintes d'un cancer du sein [61].

III. CONGÉLATION DE TISSU OVARIEN

La conservation de cortex ovarien a pour but de constituer une réserve de gamètes féminins immatures, en vue de restaurer la fonction ovarienne et la fertilité après la fin des traitements oncologiques, chez des patientes devenues en insuffisance ovarienne.

La première naissance dans l'espèce humaine a été obtenue en 2004 [62] après greffe orthotopique de tissu ovarien cryoconservé, dix ans après des résultats positifs chez la brebis [63] avec cette technique.

La loi de bioéthique autorise depuis 2004 le prélèvement de tissu germinale en vue de la préservation de la fertilité mais son utilisation potentielle n'est possible que dans le cadre d'un protocole de recherche.

À l'heure actuelle, 13 naissances ont été rapportées après réimplantation orthotopique de tissu ovarien cryoconservé [62, 64-72].

III.1. Indications de la préservation de tissu ovarien

Outre les femmes jeunes (âgées de moins de 35 ans) en âge de procréer chez lesquelles elle peut être mise en place sans délai, à n'importe quel moment du cycle et sous contraception, cette technique est la seule qui peut être proposée aux petites filles prépubères. La patiente ne doit pas présenter de contre-indication à l'anesthésie et à la chirurgie.

III.2. Prélèvement

La conservation est réalisée après concertation pluridisciplinaire et information et consentement de la patiente ou de son représentant légal lorsqu'elle est mineure.

Le prélèvement est généralement fait par coelioscopie, plus rarement par laparotomie et intéresse soit un ovaire entier, soit environ la moitié de la surface d'un ovaire. L'ovariectomie partielle est préférable lorsque le risque d'insuffisance ovarienne est modéré [73-75].

III.3. Préparation du tissu et congélation

La corticale est découpée en fragments de 1 à 2 mm d'épaisseur et de taille variable (1 cm² et 1 mm²). La congélation est réalisée selon un protocole de congélation lente, dans un milieu associant un cryoprotecteur perméable (DMSO, propanédiol, éthylèneglycol) et des substances non pénétrantes (sucrose, sérum albumine humaine). Les cryoprotecteurs sont utilisés à des concentrations variables et selon des courbes de descente en température légèrement différentes selon les équipes [62, 64, 76, 77]. Toutes les naissances ont été obtenues à l'heure actuelle après congélation lente de tissu ovarien.

D'autres techniques de congélation ultra-rapides (vitrification) ont été testées [78-81]. Dans celles-ci, le tissu est exposé à de fortes concentrations de cryoprotecteurs diffusibles pendant un temps court puis plongé directement dans l'azote liquide afin d'éviter la formation de cristaux de glace délétères. Certaines publications mettent en évidence une supériorité des techniques de vitrification sur les techniques de congélation lente [80], notamment grâce à des adaptations techniques [81, 82], d'autres ne retrouvent pas cette supériorité [83-85]. Ces techniques sont très peu utilisées en routine actuellement [86] et la poursuite d'études est nécessaire pour s'assurer de la fonctionnalité du tissu et de la qualité des follicules pour pouvoir obtenir des grossesses et des naissances [87].

III.4. Utilisation des fragments conservés

III.4.a. Autogreffe de fragments ovariens

Après décongélation rapide et passage dans plusieurs milieux contenant des concentrations décroissantes de cryoprotecteur, le tissu peut être greffé en situation orthotopique ou hétérotopique.

La greffe orthotopique est réalisée en remplaçant le tissu sur l'ovaire controlatéral (ou sur le tissu ovarien restant si l'ovariectomie a été partielle), ou dans une poche péritonéale au niveau de la fossette ovarienne. La majorité de la perte folliculaire survient pendant l'ischémie post-greffe [88] d'où l'importance de stimuler la néovascularisation, notamment en réalisant une première cœlioscopie quelques jours avant la greffe elle-même pour créer une fenêtre péritonéale pour induire l'angiogenèse et la néovascularisation selon la technique décrite par Donnez [62].

La greffe hétérotopique doit être réalisée sur un site suffisamment vascularisé et doit tenir compte de l'accessibilité pour une future ponction ovocytaire et de critères esthétiques. Les sites les plus utilisés sont la face antérieure de l'avant-bras [89] et le tissu sous-cutané abdominal [90]. Cette technique présente les avantages d'être simple et non invasive et de permettre une surveillance facile d'une éventuelle récurrence locale. Si elle permet la restauration de la fonction ovarienne [73], il n'y a pas de cas publié de naissances après prise en charge en FIV après greffe hétérotopique de tissu ovarien. La surveillance de la maturation folliculaire y est difficile et les critères de maturité en termes de diamètre folliculaire restent à préciser. L'équipe d'Oktay [91, 92] a publié 3 naissances après grossesses spontanées chez une patiente, après greffe sous-cutanée de tissu ovarien cryoprésumé. Une activité folliculaire sur l'ovaire restant, contemporaine de celle observée sur le greffon, ayant alors été mise en évidence. Oktay propose le rôle de facteurs diffusibles provenant du tissu greffé et agissant sur l'ovaire restant.

Des études récentes rapportent l'expérience des équipes ayant pratiqué le plus grand nombre de greffes orthotopiques [9, 93, 94], estimé à environ une trentaine en Europe. Il est mis en évidence l'apparition de follicules en moyenne 4,5 à 5 mois après la greffe, ce qui correspond à la durée de la folliculogénèse décrite par Gougeon, du recrutement des follicules primordiaux jusqu'au follicule ovulatoire [95]. Les variations importantes observées, entre 6 semaines et 8 mois pouvant provenir de différences dans la réserve folliculaire au moment du prélèvement [9], l'inégale répartition des follicules primordiaux dans le cortex ovarien ayant été démontrée [96, 97]. Des observations similaires sont réalisées après greffe de tissu ovarien non congelé [98].

Dans ces séries toutes les patientes ayant bénéficié d'une autogreffe, sauf une (1/19) [93, 94], ont retrouvé un fonctionnement ovarien pour une durée variant de 6 à plus de 86 mois. Cinq naissances ont été observées chez 4 patientes, 3 après des grossesses spontanées [93, 94] et deux après FIV [93].

Les patientes présentent des taux de FSH relativement élevés en phase folliculaire, ce qui s'explique probablement par le faible nombre de follicules primordiaux survivant à la greffe et les taux d'hormone antimüllérienne (AMH) sont majoritairement indétectables [93, 94]. Aucun marqueur hormonal ne semble prédictif de la survenue d'une grossesse ou non.

Ces patientes sont à considérer comme des mauvaises répondeuses et leur prise en charge en FIV a été réalisée principalement avec des stimulations légères en cycle naturel modifié [93, 99, 100]. Le nombre d'embryons obtenus par cycle est faible, (5 sur 21 cycles chez 4 patientes [99] et 16 sur 56 cycles chez 10 patientes [93]), ce qui correspond à des taux de transfert par cycle de 24 % [99] et 27 % [93] avec des taux d'implantation faibles (0 % par cycle [99] et 5 % par cycle [93]).

Après greffe hétérotopique la cinétique de mise en place de la fonction ovarienne est similaire (12 à 20 semaines après la greffe [101]), la durée de fonctionnement du greffon étant plus courte (3 à 5 mois). Après une seconde greffe la reprise du fonctionnement ovarien est plus rapide, ce qui pourrait s'expliquer par un effet résiduel du 1^{er} greffon, et plus longue (15 à 41 mois).

III.4.b. Risques de la greffe

Le risque est la réintroduction de la maladie initiale après la greffe, notamment s'il s'agit d'une leucémie ou d'une maladie avec risque de métastase ovarienne. Le risque de localisation ovarienne [89] est élevé dans les leucémies aiguës et les neuroblastomes (> 11 %), modéré dans les cancers de l'utérus et le cancer du sein (0,2 à 11 %) et faible dans les lymphomes hodgkiniens ou non (< 0,2 %).

Il a été mis en évidence la transmission d'un lymphome non hodgkinien de haut grade à des souris receveuses par le biais de fragments de tissu ovarien [102]. A contrario une étude sur du tissu ovarien de 5 femmes atteintes de lymphomes de haut grade greffé [103] chez des souris SCID n'a montré le développement d'aucun lymphome chez ces souris.

La situation semble rassurante dans les lymphomes hodgkiniens car plusieurs études n'ont pas mis en évidence de localisation ovarienne de la maladie avec des études histologiques et immuno-histochimiques [104-106]. Après greffe à des souris SCID de fragments ovariens de 13 femmes atteintes d'une maladie de Hodgkin, aucune pathologie ne s'est développée chez les souris [103]. Enfin, dans l'expérience des greffes réalisées chez plus de dix femmes ayant été traitées pour cette pathologie aucune récurrence post-greffe n'a été observée [74].

Concernant les leucémies, les études s'accordent sur le fait que la greffe éventuelle est trop risquée pour être envisageable avec mise en évidence de la présence de transcrits spécifiques par RT-PCR (technique utilisable chez les seules patientes porteuses d'un marqueur génétique spécifique de la maladie) chez la majorité des patientes testées (6 sur 8 [107] et 7 sur 10 [108]), alors que dans ces deux études les études histologiques et immunohistochimiques étaient négatives chez toutes les patientes testées (26 [107] et 18 [108]). La présence de transcrits spécifiques pour la leucémie myéloïde chronique dans le tissu ovarien avait déjà été décrite [106].

Par ailleurs il a été mis en évidence une réactivation leucémique après greffe de cortex ovarien à des souris immunodéficientes [108].

Dans le cas du cancer du sein, des études histologiques et immunohistochimiques menées sur les biopsies ovariennes de 51 patientes [109] n'ont montré aucune localisation ovarienne de la maladie, confirmant des études antérieures sur 63 [110] et 13 [111] patientes.

Une étude récente met en évidence l'absence de contamination de souris immunodéficientes greffées pendant 24 semaines avec des fragments ovariens provenant de 23 patientes ayant bénéficié d'une conservation pour une tumeur ovarienne [112].

Il est fondamental de travailler sur l'évaluation de la maladie résiduelle avant greffe, non seulement en s'assurant de l'absence de cellules malignes à l'anatomopathologie classique (tant dans le cortex que dans la médullaire avant et après congélation), mais aussi grâce à des méthodes plus performantes comme l'immunohistochimie, la cytométrie en flux, la biologie moléculaire, la greffe à des souris immunodéficientes, dont les développements devraient permettre dans l'avenir une analyse plus fiable des fragments d'ovaire permettant d'assurer l'innocuité de la greffe.

III.4.c. Quelles sont les alternatives à la greffe de cortex ovarien ?

L'existence de la maladie résiduelle et les risques en dérivant rendent nécessaire le développement de techniques alternatives à l'autogreffe de fragments de cortex ovarien [107, 113].

La maturation *in vitro* de follicules primordiaux et la xéno greffe de tissu ovarien sont des voies de recherches actuelles.

Des follicules primordiaux peuvent être isolés de tissu ovarien mécaniquement et enzymatiquement et être cultivés *in vitro* dans un gel tridimensionnel d'alginate [114, 115]. Des follicules primordiaux et primaires isolés de tissu ovarien humain décongelé survivent 7 jours en culture en poursuivant leur croissance jusqu'à 44 à 70 μm [114]. Des follicules secondaires, isolés de tissu ovarien humain frais peuvent croître

in vitro jusqu'au stade antral précoce (croissance de 175 à 715 μm), pendant 30 jours avec production de stéroïdes et croissance ovocytaire synchronone (75 à 110 μm) [115]. L'étape suivante est la maturation *in vitro* des ovocytes obtenus jusqu'au stade métaphase II. Cette technique a permis la naissance de sujets fertiles chez la souris à partir de tissu ovarien frais [116] ou congelé [117] et des embryons ont été obtenus chez le babouin [118].

D'autres équipes rapportent l'obtention de follicules antraux précoces à partir de follicules primordiaux et primaires grâce à un système de culture en 2 étapes [119].

Aucun ovocyte humain compétent (métaphase II) n'a encore été obtenu par ces techniques, ce qui rend nécessaire la poursuite d'études pour améliorer les résultats et permettre leur éventuelle utilisation en clinique [98, 120].

La xénogreffe évite le risque potentiel de retransmission de la pathologie cancéreuse et un développement folliculaire jusqu'au stade antral a été mis en évidence après greffe de fragments ovariens humains frais [121] ou décongelés [122, 123] chez des souris immunodéficientes, ainsi que l'observation des modifications pré-ovulatoires sur les follicules antraux après administration d'hCG [124, 125] et l'observation d'ovocytes en métaphase II [126]. Une étude a mis en évidence la survie à long terme (5 mois) de follicules humains isolés après xénogreffe [127]. L'utilisation clinique de ces techniques sera limitée par le risque de transmission de prions ou de virus animaux et par les problèmes éthiques soulevés ; elles sont en revanche de très bons modèles pour l'étude de la maladie résiduelle et le développement de techniques comme la greffe de follicules isolés [127].

La greffe hétérologue de fragments ovariens et d'ovaire entier a été réalisée par certaines équipes [68, 128, 129]. La greffe entre jumelles monozygotes, dont une présentait une insuffisance ovarienne prématurée, a permis la naissance de 8 enfants, dont un après congélation du tissu ovarien et un après greffe d'un ovaire entier [68, 98, 128]. D'autre part, des allogreffes de tissu ovarien frais ont également été réalisées chez 3 patientes avec comme donneuse leur sœur (ayant été la donneuse HLA compatible lors de la greffe de moelle) [129].

L'intérêt théorique de la greffe microchirurgicale d'ovaire entier est de réduire la durée de l'ischémie responsable de la perte folliculaire pendant la revascularisation [128, 130] afin d'augmenter la durée de fonctionnement du greffon. Néanmoins, la congélation d'un organe entier se heurte aux difficultés rencontrées pour délivrer rapidement la quantité adéquate de cryoprotecteurs à tous les types cellulaires et aux contraintes liées aux pentes de descente et de montée en température autorisées par la taille de l'organe [130].

De rares naissances avec ce type de techniques ont été obtenues chez la brebis [131] et seules quelques publications d'essais de congélation lente d'ovaires entiers dans l'espèce humaine ont été rapportées [132-135] montrant sa faisabilité. Des études se poursuivent, notamment des protocoles d'évaluation de la conservation d'ovaire entier par vitrification chez de gros animaux [136, 137], technique ayant permis des naissances chez la souris [138].

IV. LES APPROCHES PHARMACOLOGIQUES

L'une des approches est la mise au repos des ovaires basée sur l'observation d'une moindre sensibilité de l'ovaire pré-pubère à la chimiothérapie [139], soit par l'administration d'analogues du GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone), soit par l'administration d'œstrogènes. Une autre approche est l'utilisation d'inhibiteurs de l'apoptose.

IV.1. Utilisation d'agonistes du GnRH

Les études sur ce sujet sont nombreuses et leurs résultats contradictoires [140-144]. Deux revues récentes de la littérature mettent en évidence une diminution des insuffisances ovariennes prématurées grâce à l'administration d'agonistes avant et pendant la chimiothérapie [143, 144], sans qu'il y ait de différence statistique en termes de survenue de grossesses spontanées [143].

IV.2. Contraception orale

Un essai randomisé de phase II récent n'a pas permis de démontrer d'effet protecteur sur la réserve ovarienne de l'administration de contraceptifs oraux [142].

IV.3. Inhibiteurs d'apoptose

Un anti-apoptotique, la sphingosine 1-phosphate a montré, chez la souris, un effet de protection de l'ovocyte vis-à-vis de la doxorubicine

[145] et un effet de protection contre les rayonnements permettant la préservation de la fertilité [146]. Récemment, il a été montré que son administration dans le cadre de la xénotransplantation de tissu ovarien humain augmente l'angiogenèse dans les transplants et diminue le pourcentage de follicules apoptotiques [147], ce qui ouvre de nouvelles perspectives.

V. LA TRANSPOSITION OVARIENNE

Cette technique consiste à placer les ovaires en dehors du champ de radiothérapie, en conservant les pédicules vasculaires, afin de diminuer la dose de rayonnement reçue et donc le risque d'insuffisance ovarienne. Les indications sont essentiellement la maladie de Hodgkin, les cancers du col utérin, du vagin, du rectum ainsi que les sarcomes pelviens [148]. La transposition peut être rétro-utérine, rétro-iliaque ou latéro-colique [149]. La transposition latérale divise environ par 10 la dose de rayons reçue par les ovaires [150]. Des résultats encourageants ont été observés dans le cadre de la maladie de Hodgkin [151] avec 12 naissances après des grossesses spontanées sur une série de 11 patientes ayant bénéficié d'une transposition. Cette technique n'a d'intérêt que dans les radiothérapies localisées, n'ayant pas d'effet protecteur contre la chimiothérapie. Les complications, outre le risque de dévascularisation du pédicule ovarien au moment de la chirurgie, sont principalement des kystes ovariens bénins [152].

CONCLUSION

Les techniques de préservation de la fertilité qui peuvent être proposées aux patientes devant bénéficier d'un traitement potentiellement stérilisant (dans le cadre d'une pathologie cancéreuse ou non) sont nombreuses et en constante évolution. Il est très important qu'une information sur ces techniques soit systématiquement proposée aux patientes le plus tôt possible dans la prise en charge de leur pathologie afin qu'elles puissent mener leur réflexion et choisir ou non de bénéficier d'une ou plusieurs de ces techniques. En effet, afin d'optimiser au mieux les chances de pallier une potentielle insuffisance ovarienne future, l'association de plusieurs méthodes de préservation

de la fertilité peut être proposée comme la conservation de tissu ovarien suivie d'une stimulation de l'ovulation et d'une congélation embryonnaire [153], l'administration d'agonistes du GnRH et la conservation ovarienne [7] ou la conservation de tissu ovarien et la maturation *in vitro* d'ovocytes immatures suivie d'une vitrification [154].

L'amélioration constante des résultats obtenus avec les différentes approches proposées associée à l'émergence de nouvelles indications médicales (risque d'insuffisance ovarienne prématurée d'origine génétique ou dans le cadre de maladies auto-immunes) ou non (choix de la femme de différer un projet parental) [155] font de ces différentes techniques de préservation de la fertilité un sujet de discussion sociologique au-delà de leurs aspects techniques.

Bibliographie

- [1] Ries LAG, Percy CL, Bunin GR. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United-States SEER Program 1975-1995. In Ries LAG, Smith MA, Gurney *et al.* (eds). Bethesda, MD: National Cancer Institute 1999:1-15 [NIH Pub n° 99-4649].
- [2] Larsen EC, Muller J, Schmiegelow K, Rechnitzer 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.
- [3] Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* 2001;7:534-43.
- [4] Teinturier C, Hartmann O, Valteau-Couanet D, Benhamou E, Bougneres PF. Ovarian function after autologous bone marrow transplantation in childhood: high-dose busulfan is a major cause of ovarian failure. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:989-94.
- [5] Salooja N, Szydlo RM, Socie G, Rio B, Chatterjee R, Ljungman P, Van Lint MT, Powles R, Jackson G, Hinterberger-Fischer M, Kolb HJ, Apperley JF. Late effects working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Pregnancy outcomes after peripheral blood or bone marrow transplantation: a retrospective survey. *Lancet* 2001;358(9278):271-76.
- [6] Knopman J, Papadopoulos E, Grifo J, Fino E, Noyes N. Surviving childhood and reproductive-age malignancy: effects on fertility and future parenthood. *Lancet Oncol* 2010;11:490-8.
- [7] Lawrenz B, Jauckus J, Kupka M, Strowitzki T, von Wolff M. Fertility preservation in >1.000 patients: patients characteristics, spectrum, efficacy and risks of applied preservation techniques. *Arch Gynecol Obstet* 2011;283:651-56.
- [8] Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation and reproduction in cancer patients. *Fertil Steril* 2005;83:1622-28.
- [9] Donnez J, Jadoul P, Squifflet J, Van Langendonck A, Donnez O, Van Eyck AS, Marinescu C, Dolmans MM. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in cancer patients. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2010;24:87-100.
- [10] Zeilmaker G, Alberda A, van Gent I, Rijkmans C, Drogendijk A. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 1984;42:293-6.
- [11] De Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V, Kupka M, Nygren KG, Nyboe Andersen A. ART in Europe, 2008: results generated from Europeans registers by ESHRE. Preliminary results. *Hum Reprod* 2011;26(S1):i84.
- [12] Von Wolff M, Thaler C, Frambach T, Zeeb C, Lawrenz B, Popovici R, Strowitzki T. Ovarian stimulation to cryopreserve fertilized oocytes in cancer patients can be started in the luteal phase. *Fertil Steril* 2009;92:1360-5.
- [13] 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* 2003;18:90-5.
- [14] Oktay K, Buyuk E, Libertella N, Akar M, Rosenwaks Z. Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation. *J Clin Oncol* 2005;23:4347-53.
- [15] Azim AA, Constantini-Ferrando M, Oktay K. Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study. *J Clin Oncol* 2008;26:2630-5.
- [16] Roberts J, Oktay K. Fertility preservation: a comprehensive approach to the young woman with cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;35:57-9.
- [17] 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.
- [18] Knopman J, Noyes N, Talebian S, Krey L, Grifo J, Licciardi F. Women with cancer undergoing ART for fertility preservation: a cohort study of their response to exogenous gonadotropins. *Fertil Steril* 2009;91(4):1476-8.

- [19] Lawrenz B, Jauckus J, Kupka M, Strowitzki T, Von Wolff M. Efficacy and safety of ovarian stimulation before chemotherapy in 205 cases. *Fertil Steril* 2010;94(7):2871-3.
- [20] Michaan N, Ben-David G, Ben-Yosef D, Almog B, Many A, Pauzner D, Lessing J, Amit A, Azem F. Ovarian stimulation and emergency *in vitro* fertilization for fertility preservation in cancer patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;149:175-7.
- [21] Quintero R, Helmer A, Huang JQ, Westphal L. Ovarian stimulation for fertility preservation in patients with cancer. *Fertil Steril* 2010;93:865-8.
- [22] AbdelHafez F, Desai N, Abou-Setta A, Falcone T, Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2010;20:209-22.
- [23] Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow-freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2008;90:186-93.
- [24] Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986;19:1884-6.
- [25] Pickering SJ, Braude RP, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990;54:102-8.
- [26] Johnson M, Pickering S, George M. The influence of cooling on the properties of the zona pellucida of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1988;3:383-7.
- [27] Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH. The hardening effect of dimethylsulfoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with reduction in the number of cortical granules. *J Reprod Fertil* 1990;89:253-9.
- [28] Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997;68:724-6.
- [29] Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999;14(12):3077-9.
- [30] Gook D, Schiewe M, Osborn S, Asch R, Jansen R, Johnston W. Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propane-diol. *Hum Reprod* 1995;10:2637-41.
- [31] Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindle of oocytes and its dynamic after thawing: clinical implications in oocyte freezing - A review article. *Mol Cell Endocrinol* 2003;202:101-7.
- [32] Cobo A, Perez S, De los Santos MJ, Zulatequi J, Domingo J, Remoh J. Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008;17:350-9.
- [33] Gao S, Li Y, Gao X, Hu J, Yang H, Chen ZJ. Spindle and chromosome changes of human MII oocytes during incubation after slow freezing/fast thawing procedures. *Reprod Sci* 2009;16:391-6.
- [34] Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L, Magrini O, Buzzocchi A, Venturoli S. Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertil Steril* 2009;91:2399-407.
- [35] Gook DA, Osborn SM, Bourne H, Johnston W. Fertilization of human oocytes following cryopreservation: normal karyotypes and absence of stray chromosomes. *Hum Reprod* 1994;9:684-91.
- [36] 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.
- [37] Bianchi V, Cottichio G, Distratis V, Di Giusto N, Flamigni C, Borini A. Differential sucrose concentration during dehydration (0.2 Mol/L) and rehydration (0.3 Mol/L) increases the implantation rate of frozen human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2007;14:64-71.
- [38] De Santis L, Cino I, Rabellotti E, Papaleo E, Calzi F, Fusi FM, Brigante C, Ferrari A. Oocyte cryopreservation: clinical outcome of slow cooling protocols differing in sucrose concentration. *Reprod Biomed Online* 2007;14:57-63.
- [39] Yoon TK, Chung HM, Lim JM, Han SY, Ko JJ, Cha EY. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated *in vitro* fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 2000;734:180-1.
- [40] Kuwayama M, Valta G, Kato O, Leibo S. Highly efficient vitrification method for

- cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11:300-8.
- [41] Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010;25(9):2239-2246.
- [42] Grifo J, Noyes N. Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional *in vitro* fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients. *Fertil Steril* 2010;93(2):391-6.
- [43] Kim T, Laufer L, Hong SW. Vitrification of oocytes produces high pregnancy rates when carried out in fertile women. *Fertil Steril* 2010;93(2):467-74.
- [44] Cao YX, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow freezing and vitrification. *Fertil Steril* 2009;92:1306-11.
- [45] Fadini R, Brambillasca F, Renzini MM. Human oocyte cryopreservation: comparison between slow and ultrarapid methods. *Reprod Biomed Online* 2009;19:171-80.
- [46] Chian RC, Huang JY, Tan SL, Lucena E, Saa A, Rojas A, Ruvalcaba Castellón LA, García Amador MI, Montoya Sarmiento JE. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008;16:608-10.
- [47] 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.
- [48] Noyes N, Boldt J, Nagy ZP. Oocyte cryopreservation: is it time to remove its experimental label? *J Assist Reprod Genet* 2010;27:69-74.
- [49] Ata B, Chian RC, Tan SL, Dodds JE. Cryopreservation of oocytes and embryos for fertility preservation for female cancer patients. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2010;24:101-12.
- [50] Noyes N, Knopman J, Melzer K, Fino ME, Friedman B, Westphal L. Oocyte cryopreservation as a fertility preservation measure for cancer patients. *Reprod Biomed Online* 2011, doi:10.1016/j.rbmo.2010.11.011. In press.
- [51] Boldt J. Current results with slow freezing and vitrification of the human oocyte. *Reprod Biomed Online* 2011, doi:10.1016/j.rbmo.2010.11.019. In press.
- [52] Winingger J, Kort H. Cryopreservation of immatures and matures oocytes. *Semin Reprod Med* 2002;20:45-9.
- [53] Amorin C, Goncalves P, Figueiredo C. Cryopreservation of oocytes from pre-antral follicles. *Hum Reprod* 2003;9:119-29.
- [54] Toth T, Baka S, Veeck L, Jones HW Jr, Muasher S, Lanzendorf S. Fertilization and *in vitro* development of cryopreserved human prophase I oocytes. *Fertil Steril* 1994;61:891-4.
- [55] Toth T, Lanzendorf S, Sandow B, Veeck L, Hassen W, Hansen S, Hogden G. Cryopreservation of human prophase I oocytes collected from unstimulated follicles. *Fertil Steril* 1994;61:1445-50.
- [56] Son W, Park S, Lee K, Lee W, Ko J, Yoon T, Cha K. Effects of 1,2- propane-diol and freezing- thawing on the *in vitro* development capacity of human immature oocytes. *Fertil Steril* 1996;66:995-9.
- [57] Tucker M, Wright G, Morton P, Massey J. Birth after cryopreservation of immature oocyte with subsequent *in vitro* maturation. *Fertil Steril* 1998;70:578-9.
- [58] Cao Y, Xing Q, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P, Cong L. Cryopreservation of immature and *in vitro* matured human oocytes by vitrification. *Reprod Biomed Online* 2009;19:369-73.
- [59] Durga Rao D, Chian RC, Son WS, Gilbert L, Tan SL. Fertility preservation in women undergoing cancer treatment. *Lancet* 2004;363:1829-30.
- [60] Huang JY, Buckett WM, Gilbert L, Tan SL, Chian RC. Retrieval of immature oocytes followed by *in vitro* maturation and vitrification: a case report on a new strategy of fertility preservation in women with borderline ovarian malignancy. *Gynecol Oncol* 2007;105:542-4.
- [61] Huang JY, Chian RC, Gilbert L, Fleischer D, Holzer H, Dermatis E, Elizur SE, Gidoni Y, Levin D, Son WY, Tan SL. Retrieval of immature oocytes from unstimulated ovaries followed by *in vitro* maturation and vitrification: a novel strategy of fertility preservation for breast cancer patients. *Am J Surgery* 2010;200:177-83.
- [62] Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonck A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364(9443):1405-10.

- [63] Gosden R, Baird D, Wade J, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196° C. *Hum Reprod* 1994;9:597-603.
- [64] Meirou D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, Schiff E, Dor J. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 2005;353:318-21.
- [65] Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist* 2007;12:1437-42.
- [66] Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG, Loft A, Ottosen C, Dueholm M, Schmidt KL, Andersen AN, Ernst E. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod* 2008;23:2266-72.
- [67] Ernst E, Bergholdt S, Jorgensen JS, Andersen CA. The first woman who gives birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod* 2010;25:1280-1.
- [68] Silber SJ, DeRosa M, Pineda J, Lenahan K, Grenia D, Gorman K, Gosden RG. A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. *Hum Reprod* 2008;23:1531-7.
- [69] Sanchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, Cobo AC, Escribá MJ, Simón C, Pellicer A. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril* 2010;93:268.e11-3.
- [70] Demeestere I, Simon P, Moffa F, Delbaere A, Englert Y. Birth of a second healthy baby more than 3 years after cryopreserved ovarian graft. *Hum Reprod* 2010;25:1590-1.
- [71] Roux C, Amiot C, Agnani G, Aubard Y, Rohrllich PS, Piver P. Live birth after ovarian tissue autograft in a patient with sickle cell disease treated by allogenic bone marrow transplantation. *Fertil Steril* 2010;93:2413.e5-9.
- [72] Donnez J, Squifflet J, Jadoul P, Demyelle D, Cheron AC, Van Langendonck A, Dolmans MM. Pregnancy and live birth after autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue in a patient with metastatic disease undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Fertil Steril* 2011;95:1787.e1-4.
- [73] Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 2000;342:1919.
- [74] Von Wolff M, Donnez J, Hovatta H, Keros V, Maltaris T, Montag M, Salle B, Sonmezer M, Andersen CY. Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy-A technique its infancy but already successful in fertility preservation. *Eu J Cancer* 2009;45:1547-53.
- [75] Anderson R, Wallace H. Fertility preservation in girls and young women. *Clinical Endocrinology* 2011;doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04100.x.in press.
- [76] Hovatta O, Sylve R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G, Lass A, Winston RM. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulfoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod* 1996;11:1268-72.
- [77] Schmidt KL, Ernst E, Byskov AG, Nyboe Andersen A, Andersen CY. Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation. *Hum Reprod* 2003;18:2654-9.
- [78] Lee SH, Shin CS, Ko JJ, Lee HC, Park C, Lee KA. In vitro culture of the human adult ovarian tissue after vitrification: comparison among detection methods of the culture effect. *Fertil Steril* 2000;74(1):161.
- [79] Isachenko E, Isachenko V, Rahimi C, Nawroth F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;108:186-193.
- [80] Keros V, Xella S, Hulthenby K, Pettersson K, Sheikh M, Volpe A, Hreinsson, Hovatta O. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009;24:1670-83.
- [81] Zhou XH, Wu YJ, Shi J, Xia YX, Zheng SS. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology* 2010;60:101-105.
- [82] Chang HJ, Moon JH, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Optimal condition of vitrification method for cryopreservation of human ovarian cortical tissues. *J Obstet Gynaecol Res* 2011;19. doi:10.1111/j.1447-0756.2010.01496.x.in press.

- [83] Isachenko V, Isachenko E, Reinsberg J, Montag M, van der Ven K, Dorn C, Roesing B, van der Ven H. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of rapid and conventional freezing. *Cryobiology* 2007;55:261-8.
- [84] Isachenko V, Isachenko E, Kreienberg R, Woriedh M, Weiss JM. Human ovarian tissue cryopreservation: quality of follicles as a criteria of effectiveness. *Reprod Biomed Online* 2010; 20:441-2.
- [85] Rahimi G, Isachenko V, Kreienberg R, Sauer H, Todorov P, Tawadros S, Mallmann P, Nawroth F, Isachenko E. Re-vascularisation in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;149:63-7.
- [86] Silber S, Kagawa N, Kuwayama M, Gosden R. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertil Steril* 2010; 94:2191-6.
- [87] Amorim C, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2011;23:160-86.
- [88] Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM, Gosden RG. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196° C. *Endocrinol* 1999;140:462-71.
- [89] Oktay K, Economos K, Kan M, Rucinski J, Veeck L, Rozenwaks Z. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *J Am Med Assoc* 2001;286:1490-3.
- [90] Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;363:837-40.
- [91] Oktay K. Spontaneous conception and live birth after heterotopic ovarian transplantation: is there a germline stem cell connection? *Hum Reprod* 2006;21:1345-8.
- [92] Oktay K, Türkçüoğlu I, Rodriguez-Wallberg K. Four spontaneous pregnancies and three live births following subcutaneous transplantation of frozen banked ovarian tissue: what is the explanation? *Fertil Steril* 2011; 95(2):804.e7-10.
- [93] Schmidt K, Rosendahl M, Ernst E, Loft A, Andersen AN, Dueholm M, Ottosen C, Andersen CY. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in 12 women with chemotherapy-induced premature ovarian failure: the Danish experience. *Fertil Steril* 2011;95:695-701.
- [94] Janse F, Donnez J, Anciaert E, de Jong H, Fauser B, Dolmans MM. Limited value of ovarian function markers following orthotopic transplantation of ovarian tissue after gonadotoxic treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96: 1136-44.
- [95] Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;17:121-55.
- [96] Qu J, Godin PA, Nisolle M, Donnez J. Distribution and epidermal growth factor expression of primordial follicles in human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2000;15:302-310.
- [97] Schmidt KL, Byskov AC, Nyboe Andersen A, Müller J, Yding Andersen C. Density and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human ovaries. *Hum Reprod* 2003;18:1158-64.
- [98] Silber S, Woodruff T, Shea L. To transplant or not to transplant? That is the question. *Cancer Treat Res* 2010;156:41-54.
- [99] Dolmans MM, Donnez J, Camboni A, Demylle D, Amorim C, Van Langendonck A, Pirard C. IVF outcome in patients with orthotopically transplanted ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009;24:2778-87.
- [100] Meirou D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Yemini Z, Dor J. Monitoring the ovaries after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue: endocrine studies, *in vitro* fertilization cycles, and live birth. *Fertil Steril* 2007;87:418.e7-e15.
- [101] Kim S, Lee W, Chung M, Lee HC, Lee HH, Hill D. Long-term ovarian function and fertility after heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue: 8-year experience in cancer patients. *Fertil Steril* 2009;91:2349-54.
- [102] Shaw JM, Bowles J, Koopman P, Wood EC, Trounson AO. Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients. *Hum Reprod* 1996;11:1668-73.
- [103] Kim SS, Radford J, Harris M, Varley J, Rutherford AJ, Lieberman B, Shalet S, Gosden R. Ovarian tissue harvested from lymphoma patients

to preserve fertility may be safe for auto-transplantation. *Hum Reprod* 2001;16:2056-60.

[104] Seshadri T, Gook D, Lade S, Spencer A, Grigg A, Tiedemann K, McKendrick J, Mitchell P, Stern C, Seymour JF. Lack of evidence of disease contamination in ovarian tissues harvested for cryopreservation from patients with Hodgkin lymphoma and analysis of factors predictive of oocyte yield. *Br J Cancer* 2006;94:1007-10.

[105] Meirow D, Ben Yehuda D, Prus D, Poliack A, Schenker JG, Rachmilewitz EA, Lewin A. Ovarian tissue banking in patients with Hodgkin disease: is it safe? *Fertil Steril* 1998;69:996-8.

[106] Meirow D, Hardan I, Dor J, Fridman E, Elizur S, Ra'anani H, Slyusarevsky E, Amariglio N, Schiff E, Rechavi G, Nagler A, Ben Yehuda D. Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients. *Hum Reprod* 2008;23:1007-13.

[107] Rosendahl M, Andersen MT, Ralfkiaer E, Kjeldsen L, Andersen MK, Andersen CY. Evidence of residual disease in cryopreserved ovarian cortex from female patients with leukemia. *Fertil Steril* 2010;94:2186-90.

[108] 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.

[109] Rosendahl M, Timmermans Wielenga V, Nedergaard L, Kristensen SG, Ernst E, Rasmussen PE, Anderson M, Schmidt KT, Andersen CY. Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation: no evidence of malignant cell contamination in ovarian tissue from patients with breast cancer. *Fertil Steril* 2011;95:2158-61.

[110] Sanchez-Serrano M, Novella-Maestre E, Rosello-Sastre E, Camarasa N, Teruel J, Pellicer A. Malignant cells are not found in ovarian cortex from breast cancer patients undergoing ovarian cortex cryopreservation. *Hum Reprod* 2009;24:2238-43.

[111] Azem F, Hasson J, Ben-Yosef D, Kossoy N, Cohen T, Almog B, Amit A, Lessing JB, Lifschütz-Mercer B. Histologic evaluation of fresh human ovarian tissue before cryopreservation. *Int J Gynecol Pathol* 2010;29:19-23.

[112] Lotz L, Montag M, van der Ven H, von Wolff M, Mueller A, Hoffmann I, Wachter D, Beckmann M, Dittrich R. Xenotransplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with

ovarian tumors into SCID mice - No evidence of malignant cell contamination. *Fertil Steril* 2011;95:2612-4.

[113] Sonmezer M, Oktay K. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2010;24:113-26.

[114] Amorim CA, Van Langendonck A, David A, Dolmans MM, Donnez J. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and *in vitro* culture in a calcium alginate matrix. *Hum Reprod* 2009;24:92-9.

[115] Xu M, Barrett S, West-Farrell E, Kondapalli L, Kiesewetter S, Shea L, Woodruff T. In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth. *Hum Reprod* 2009;24:2531-40.

[116] Xu M, Kreeger PK, Shea LD, Woodruff TK. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue Eng* 2006;12:2739-46.

[117] Wang X, Catt S, Pangestu M, Temple-Smith P. Successful *in vitro* culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization and live births. *Reproduction* 2011;14:183-91.

[118] Xu M, Fazleabas A, Shikanov A, Jackson E, Barrett S, Hirsfeld-Cytron J, Kiesewetter S, Shea L, Woodruff T. In vitro oocyte maturation and preantral follicle culture from the luteal-phase baboon ovary produce mature oocytes. *Biol Reprod* 2011;84:689-97.

[119] Telfer E, McLaughlin M, Ding C, Thong J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod* 2008;23:1151-8.

[120] Smitz J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, Picton HM, Plancha C, Shea LD, Stouffer RL, Telfer EE, Woodruff TK, Zelinski MB. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum Reprod Update* 2010;16:395-414.

[121] Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 1998;13:1133-8.

[122] Gook D, McCully B, Edgar D, McBain J. Development of antral follicles in human

- cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 2001;16:417-22.
- [123] Van den Broecke R, Liu J, Handyside A, Van der Elst JC, Krausz T, Dhont M, Winston RM, Hovatta O. Follicular growth in fresh and cryopreserved human ovarian cortical grafts transplanted to immunodeficient mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;97:193-201.
- [124] Gook D, Edgar D, Borg J, Archer J, Lutjen P, McBain J. Oocyte maturation, follicle rupture and luteinization in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 2003;18:1772-81.
- [125] Kim S, Soules M, Battaglia D. Follicular development, ovulation and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation. *Fertil Steril* 2002;78:77-82.
- [126] Gook D, Edgar D, Borg J, Archer J, McBain J. Diagnostic assessment of the developmental potential of human cryopreserved ovarian tissue from multiple patients using xenografting. *Hum Reprod* 2005;20:72-8.
- [127] Dolmans MM, Yuan WY, Camboni A, Torre A, Van Langendonck A, Martinez-Madrid B, Donnez J. Development of antral follicles after xeno-grafting of isolated small human pre-antral follicles. *Reprod Biomed Online* 2008;16:705-11.
- [128] Silber SJ, Grudzinskas G, Gosden RG. Successful pregnancy after microsurgical transplantation of an intact ovary. *N Engl J Med* 2008;359:2617-8.
- [129] Donnez J, Squifflet J, Pirard P, Jadoul P, Dolmans MM. Restoration of ovarian function after allografting of ovarian cortex between genetically non-identical sisters. *Hum Reprod* 2010;25:2489-95.
- [130] Kim SS. Time to re-think: ovarian tissue transplantation versus whole ovary transplantation. *Reprod Biomed Online* 2010;20:171-4.
- [131] Imhof M, Bergmeister H, Lipovac M, Rudas M, Hofstetter G, Huber J. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. *Fertil Steril* 2006;85(1):1208-15.
- [132] Bedaiwy MA, Hussein MR, Biscotti C, Falcone T. Cryopreservation of intact human ovary with vascular pedicle. *Hum Reprod* 2006;21:3258-69.
- [133] Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrere S, Donnez J. Freezing-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril* 2004;82:1390-4.
- [134] Martinez-Madrid B, Camboni A, Dolmans MM, Nottola S, Van Langendonck A, Donnez J. Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. *Fertil Steril* 2007;87:1153-65.
- [135] Milenkovic M, Gharemani M, Bergh A, Wallin A, Mölne J, Fazlagic E, Eliassen E, Kahn J, Brännström M. The human postmenopausal ovary as a tool for evaluation of cryopreservation protocols towards whole ovary cryopreservation. *J Assist Reprod Genet* 2011 May;28(5):453-60. Epub 2011 Feb 25.
- [136] Courbière B, Caquant L, Mazoyer C, Franck M, Lornage J, Salle B. Difficulties improving ovarian functional recovery by microvascular transplantation and whole ovary vitrification. *Fertil Steril* 2009;91:2697-706.
- [137] Zhang JM, Sheng Y, Cao YZ, Wang HY, Chen ZJ. Cryopreservation of whole ovaries with vascular pedicles: vitrification or conventional freezing? *J Assist Reprod Genet* 2011;28:445-52.
- [138] Migishima F, Suzuki Migishima R, Song SY, Kuramochi T, Azuma S, Nishijima M, Yokoyama M. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol Reprod* 2003;68:881-7.
- [139] Blumenfeld Z, Dann E, Avivi I, Epelbaum J, Rowe JM. Fertility after treatment for Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 2002;Suppl 1:138-47.
- [140] Oktay K, Sönmez M, Oktem O, Fox K, Emons G, Bang H. Absence of conclusive evidence for the safety and efficacy of gonadotropin-releasing hormone analogue treatment in protecting against chemotherapy-induced gonadal injury. *Oncologist* 2007;12:1055-66.
- [141] Blumenfeld Z, Avivi I, Eckman A, Epelbaum R, Rowe JM, Dann EJ. Gonadotropin-releasing hormone agonist decreases chemotherapy-induced gonadotoxicity and premature ovarian failure in young female patients with Hodgkin lymphoma. *Fertil Steril* 2008;89:166-73.
- [142] Behringer K, Wildt L, Mueller H, Mattle V, Ganitis P, van den Hoonaard B, Ott HW, Hofer S, Pluetschow A, Diehl V, Enfert A, Borchmann P; German Hodgkin Study Group. No protection of the ovarian follicle pool with the use of GnRH-analogues or oral contraceptives in young women treated with escalated BEACOPP

for advanced-stage Hodgkin lymphoma. Final results of a phase II trial from the German Hodgkin Study Group. *Ann Oncol* 2010;21:2052-60.

[143] Bedaiwy MA, Abou-Setta AM, Desai N, Hurd W, Starks D, El-Nashar SA, Al-Inany HG, Falcone T. Gonadotropin-releasing hormone analog cotreatment for preservation of ovarian function during gonadotoxic chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2011;95:906-14.

[144] Del Mastro L, Giraudi S, Levaggi A, Pronzato P. Medical approaches to preservation of fertility in female cancer patients. *Expert Opin Pharmacother* 2011;12:387-96.

[145] Morita Y, Perez GI, Paris, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Xie Z, Reed JC, Schuchman EH, Kolesnick RN, Tilly JL. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med* 2000;6:1109-14.

[146] Paris F, Perez GI, Fuks Z, Haimovitz-Friedman A, Nguyen H, Bose M, Ilagan A, Hunt PA, Morgan WF, Tilly JL, Kolesnick R. Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring. *Nat Med* 2002;8:901-2.

[147] Soleimani R, Heytens E, Oktay K. Enhancement of neo-angiogenesis and follicle survival by Sphingosine-1-Phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *PLoS ONE* 2011;6:e19475.

[148] Morice P, Juncker L, Rey A, El-Hassan J, Haie-Meder C, Castaigne D. Ovarian transposition for patients with cervical carcinoma treated by radiosurgical combination. *Fertil Steril*

2000;74:743-8.

[149] Gauthier T, Leperlier F, Donadel L, Durand LM, Piver P, Aubard Y. Fertilité et grossesse après chimiothérapie et radiothérapie. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Gynécologie Obstétrique 2010;5-049-C-15.

[150] Gaetini A, De Simone M, Urgesi A, Levis A, Resegotti A, Ragona R, Anglesio S. Lateral high abdominal ovariopexy: an original surgical technique for protection of the ovaries during curative radiotherapy for Hodgkin's disease. *J Surg Oncol* 1988;39:22-8.

[151] Terenziani M, Piva L, Meazza C, Gandola L, Cefalo G, Merola M. Oophoropexy: a relevant role in preservation of ovarian function after pelvic irradiation. *Fertil Steril* 2009;91:935.e15-16.

[152] Maltaris T, Seufert R, Fischl F, Schaffrath M, Pollow K, Koelbl H, Dittrich R. The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preserving fertility. *EJOG* 2007;130:148-55.

[153] Huober-Zeeb C, Lawrenz B, Popovici R, Strowitzki T, Germeyer A, Stute P, von Wolff M. Improving fertility preservation in cancer: ovarian tissue cryobanking followed by ovarian stimulation can be efficiently combined. *Fertil Steril* 2011;95:342-4.

[154] Huang J, Tulandi T, Holzer H, Tan SL, Chian RC. Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval of immatures oocytes followed by *in vitro* maturation and vitrification: an additional strategy of fertility preservation. *Fertil Steril* 2008;89:567-72.

[155] Gidoni Y, Holzer H, Tulandi T, Tan SL. Fertility preservation in patients with non-oncological conditions. *Reprod Biomed Online* 2008;16:792-800.

