

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

**Extrait des
Mises à jour
en Gynécologie
et Obstétrique**

—
**Tome XXVII
publié le 27.11.2003**



*VINGT-SEPTIÈMES JOURNÉES NATIONALES
Paris, 2003*

La cryopréservation du tissu ovarien

Y. AUBARD*
(Limoges)

La cryopréservation du tissu ovarien (CPTO) a pour but de constituer une réserve des gamètes féminins, comme la cryopréservation du sperme le permet chez l'homme. Cependant il existe une grande différence entre la CPTO et la cryopréservation du sperme : chez la femme, seuls les follicules primordiaux survivent au processus de la congélation/décongélation/greffe ; il s'agit donc du stockage de gamètes immatures et il est nécessaire, après la décongélation de ces gamètes, d'obtenir leur maturation si l'on veut parvenir à des fécondations en vue de grossesses. Ceci explique que si l'autoconservation du sperme est un procédé classique d'aide médicale à la procréation (AMP), bien établi et qui a fait ses preuves, la CPTO en est encore à ses débuts et seules quelques rares tentatives d'autogreffes ont été rapportées à ce jour dans l'espèce humaine.

Nous envisagerons dans un premier temps de faire un état des lieux des travaux de recherche sur la CPTO, puis nous verrons quelles indications nous pouvons retenir pour cette nouvelle technique et enfin nous aborderons les problèmes éthiques et législatifs.

* Service de Gynécologie-Obstétrique – CHU Dupuytren –
2 avenue Martin-Luther-King – 87042 LIMOGES

LA TECHNIQUE DE LA CPTO

Le prélèvement du tissu ovarien

Chez la femme, la coelioscopie est un moyen idéal pour prélever la quantité désirée de tissu ovarien avec un minimum d'altération de l'appareil génital. Si l'ovaire entier est prélevé, il est préférable d'éviter l'électrocoagulation à proximité du cortex, qui pourrait détruire des follicules. Si l'on ne désire que des biopsies de cortex ovarien, ces dernières peuvent être réalisées aux ciseaux. Meirou et coll. ont également décrit un instrument de type emporte-pièce, utilisable en coelioscopie permettant de réaliser des biopsies de 5 mm de diamètre sur 2 à 3 mm de profondeur (1). L'extraction de l'ovaire (ou du fragment ovarien prélevé) doit être la moins traumatisante possible pour le cortex qui contient les follicules. L'ensachage est recommandé et une contre-incision de 2 cm est en générale suffisante pour extraire sans dommage l'ovaire entier.

Un autre intérêt non négligeable de la coelioscopie est la possibilité, dès le lendemain de l'intervention si cela est nécessaire, de débiter un traitement anticancéreux, ce qui est souvent nécessaire dans les indications habituelles de la CPTO comme nous le verrons plus loin. Enfin, la coelioscopie permet de faire un bilan de l'appareil génital de la patiente qui pourra s'avérer utile dans l'optique d'une éventuelle réimplantation du tissu et d'une fertilité future. Le prélèvement ovarien coelioscopique est également parfaitement adapté à l'enfant, même très jeune.

En cas de contre-indication à la coeliochirurgie, la laparotomie reste toujours une alternative possible pour réaliser le prélèvement de tissu ovarien.

Le conditionnement du tissu

Les deux grandes fonctions ovariennes (exocrine et endocrine) sont assurées par les follicules qui contiennent à la fois les gamètes et les cellules somatiques capables de sécréter les hormones ovariennes. Le tissu ovarien adjacent aux follicules pourrait être abandonné s'il était possible d'isoler les follicules et ne conserver qu'eux. Cependant, s'il est relativement simple d'isoler les follicules primordiaux de la souris par désagrégation enzymatique, la chose est beaucoup plus complexe pour le tissu ovarien humain, où les follicules se trouvent dans

un cortex très dense (2). Actuellement, il est donc nécessaire de conserver le cortex ovarien adjacent aux follicules avec ces derniers. Les follicules primordiaux sont situés très superficiellement dans ce cortex dont on peut ne garder qu'une mince couche d'un millimètre d'épaisseur. La surface optimale des fragments de cortex n'est pas déterminée avec certitude. Plusieurs auteurs ont congelé de tout petits fragments de l'ordre du mm², mais de bons résultats ont également été rapportés avec des fragments nettement plus gros, de l'ordre de 1 cm², voire plus.

Les fragments sont congelés dans un soluté et en présence d'un cryoprotecteur. Plusieurs solutés ont été utilisés : le Leibowitz (3-7) ; le RPMI (8) ; le PBS (*phosphate buffered saline*) contenant de la sérum albumine humaine (9) et l'*alpha minimal essential medium* (alpha-MEM; Gibco) (10). Il est préférable d'agiter les greffons ovariens dans leur milieu pour favoriser la pénétration du cryoprotecteur. Cette phase doit être faite à une température basse de 4°C pour minimiser l'ischémie chaude et les effets néfastes de certains cryoprotecteurs (DMSO) à température ambiante. Certains auteurs insistent sur l'étape de déshydratation du tissu avant la congélation, ainsi Gook préconise-t-elle une phase de déshydratation de 90 min en une étape à l'aide de sucrose (9).

Le choix du cryoprotecteur est également important. Newton et coll. ont testé le tissu humain avec quatre cryoprotecteurs sur un modèle de xénogreffe dans la souris SCID (3). On peut conclure de ces travaux que le DMSO ou l'éthylène glycol sont parfaitement adaptés à la congélation du tissu ovarien humain et que les taux de survie folliculaire sont compatibles avec une application pratique de ces recherches. Gook et coll. ont également rapporté de très bons résultats en utilisant le 1,2 propanediol (9).

Il pourrait imaginer de conserver tout l'ovaire avec sa vascularisation et de réaliser une transplantation (avec anastomose des pédicules vasculaires) et non pas une greffe du tissu ovarien. La réanastomose des pédicules vasculaires après conservation permettrait alors une réoxygénation rapide du tissu. Cependant, les possibilités actuelles de la cryobiologie permettent de conserver des cellules, voire des tissus ; mais il est classiquement impossible de faire survivre après congélation/décongélation un organe entier. Ces notions classiques de cryobiologie pourraient cependant être remises en question par les travaux de Imhof et coll. (11) qui sont parvenus à congeler un ovaire entier chez le porc et à le réanastomoser après décongélation avec survie des follicules. Wang et coll. sont également parvenus à obtenir des grossesses chez le rat en congelant de l'ovaire entier et en réalisant ensuite des auto-

transplantations avec anastomoses vasculaires (12, 13). Ces travaux préliminaires méritent confirmation et la congélation de l'ovaire entier reste donc une intéressante perspective d'avenir.

La congélation et la décongélation du tissu ovarien

Les premiers travaux en matière de congélation de tissu ovarien ont débuté dans les années 1950-1960. Pendant cette décennie, plusieurs auteurs anglais (14-18) ont établi les principes fondamentaux de la CPTO tels qu'ils sont encore appliqués de nos jours :

- Le tissu ovarien ne survit à la congélation que s'il est mis en présence d'un cryoprotecteur ;

- La descente en congélation doit être lente (« *slow cooling* ») ; la courbe de descente proposée à l'époque était de 1 à 2°C par minute jusqu'à -40°C, ensuite, la descente était beaucoup plus rapide jusqu'à la température de stockage qui était de -140°C ;

- Tous les follicules matures ou en croissance sont détruits par la congélation ;

- Seuls les follicules primordiaux survivent à cette congélation, à des taux cependant faibles à l'époque (5 %) avec le glycérol comme cryoprotecteur ;

- La décongélation doit être au contraire rapide (« *rapid thawing* ») et la greffe réalisée immédiatement après car le tissu ovarien décongelé s'altère très vite.

Les résultats de ces travaux princeps, s'ils sont fondamentaux pour nos connaissances actuelles, semblaient montrer les limites de la congélation du tissu ovarien puisque seulement 5 % des follicules primordiaux survivaient à la congélation chez le rat selon Green (17). Quoi qu'il en soit, ce faible taux de survie a permis à Parrott (18) d'obtenir la première gestation à partir de tissu ovarien congelé chez la souris en 1960.

C'est Gosden (4, 5, 19) qui a remis à l'ordre du jour la cryopréservation du tissu ovarien, essentiellement dans le but de préserver la fertilité des jeunes femmes soumises à un traitement anticancéreux. En 1990 (4), il proposait une courbe de descente en température inspirée du *slow cooling*, avec des résultats encourageants. Cette descente est faite de plusieurs paliers. Les tubes ou les paillettes contenant les greffons sont mis dans un congélateur programmable dont la température de départ se situe vers +5°C. La descente est alors de 2 °C/min. jusqu'à -9°C. Un *seeding* est alors réalisé, soit manuellement soit automatiquement, puis la descente est reprise à 0,3°C/min. jusqu'à -40°C.

Ensuite, la vitesse de descente en température est accélérée à 10°C/min. jusqu'à -140°C. Les tubes sont alors retirés du congélateur et stockés dans l'azote liquide. La plupart des auteurs contemporains travaillent avec ce type de descente en température ou des courbes voisines.

Certains travaux récents ont comparé le *slow cooling* avec des procédés plus rapides de congélation (semi-rapide ou vitrification). Si les premiers résultats obtenus avec ces autres protocoles étaient moins bons qu'avec le *slow cooling* (9), certains auteurs dans des travaux récents semblent obtenir de bons résultats chez la souris (20) et avec du tissu humain (21).

La décongélation est réalisée par la plupart des équipes selon un « *rapid thawing* » : les tubes ou les paillettes sont extraits de l'azote liquide et plongés dans un bain-marie à 25°C. Dès le dégel des milieux de congélation, les fragments ovariens sont retirés et lavés. Le tissu doit ensuite être utilisé rapidement.

L'utilisation du tissu ovarien

Nous avons vu que seuls les follicules primordiaux survivaient à la congélation. L'inconvénient de cet état de choses est qu'à la décongélation, les ovocytes survivants sont immatures et donc impropres à la fécondation immédiate. Une maturation folliculaire et ovocytaire est nécessaire avant la fécondation. Cette maturation folliculaire peut être réalisée en théorie selon plusieurs modalités.

L'autogreffe d'ovaire

La greffe de fragments ovariens est un modèle expérimental qui a fait ses preuves depuis de nombreuses années dans de multiples espèces (22). Le choix du site de ces autogreffes est très important et de très nombreux sites ont été testés (22). Si l'on réimplante le tissu dans sa situation princeps (greffe orthotopique), on peut espérer une fertilité naturelle sans recours à d'autres méthodes d'AMP. On peut également imaginer la réimplantation dans un autre site (greffe hétérotopique) et le recours à la fécondation *in vitro* pour obtenir une grossesse.

L'autogreffe orthotopique de tissu ovarien

La première grossesse obtenue avec ce modèle fut celle de Parrott (18) en 1960 qui réalisa une greffe orthotopique chez la souris ; ces travaux furent repris et confirmés à une plus large échelle par la suite

chez la souris (4, 23) et le rat (24). Gosden et coll. ont enfin obtenu la première grossesse chez la brebis (5).

Le problème pratique qui se pose est celui de la réimplantation du tissu ovarien. Gosden, chez la brebis, a amarré les fragments ovariens sur le ligament large à proximité du pavillon tubaire. Il n'a obtenu que deux grossesses, l'une avec un greffon congelé, l'autre avec un greffon non congelé. Ces résultats encourageants montraient néanmoins un faible taux de succès de cette technique. Deux auteurs ont néanmoins pu confirmer les résultats de Gosden et coll. en obtenant également des grossesses chez la brebis (25, 26) dans de plus larges proportions que Gosden et coll.. Salle et coll. ont même obtenu deux gestations consécutives chez une même brebis autogreffée, prouvant la viabilité à long terme des greffons. Cette viabilité à long terme est en effet une question primordiale : à quelle vitesse la réserve folliculaire des greffons sera-t-elle épuisée après la greffe ? Les premières observations de Baird et coll. (27) étaient inquiétantes, le fait de pouvoir obtenir deux grossesses consécutives avec le même greffon est donc une donnée importante que seuls Salle et coll. ont pu démontrer à ce jour.

Il est donc clair que cette technique a des chances d'être fonctionnelle dans l'espèce humaine, c'est d'ailleurs une autogreffe orthotopique qui a été essayée par Oktay et coll. lors de la première tentative d'utilisation de tissu ovarien congelé chez la femme (28). Oktay a choisi pour sa patiente de transfixier les greffons par un fil (60 greffons d'un mm³ environ) et de les positionner en coelioscopie sous le feuillet postérieur du ligament large, renonçant donc ainsi d'emblée à une fertilité naturelle spontanée. La patiente n'a pas ovulé spontanément, mais elle a répondu à une induction d'ovulation 3 mois après la greffe (28). Nous pensons qu'il est préférable de réaliser des greffons plus gros, de l'ordre du cm² et de les amarrer bien à plat sur le site receveur pour favoriser la revascularisation rapide des follicules primordiaux (6). C'est cette technique qui a été utilisée par Radford dans le second rapport de greffe orthotopique publié à ce jour dans l'espèce humaine (29). Le résultat pour cette patiente, pourtant âgée de 36 ans, a été la sécrétion d'estrogènes par le greffon en dehors de toute stimulation.

Plusieurs patientes ont été greffées à travers le monde avec des résultats qui semblent plus encourageants que les tout premiers rapports en termes de croissance folliculaire (ces travaux ne sont pas encore publiés), cependant aucune grossesse n'a encore été rapportée.

L'autogreffe hétérotopique de tissu ovarien

Une alternative serait de réimplanter le tissu ovarien dans un autre site que sa situation originelle, réalisant ainsi une greffe hétérotopique.

Gosden a obtenu des grossesses ainsi chez la souris (4). Nous avons réimplanté des greffons ovariens congelés, puis décongelés sous la peau du ventre chez des brebis (6). Nous avons constaté que la survie folliculaire était faible (10 % environ). Nous avons obtenu des ovulations spontanées chez la majorité des animaux et des maturations ovocytaires complètes après stimulation. Nous avons obtenu des fécondations in vitro, mais les embryons ne progressèrent pas plus loin que le stade 4 cellules, aucun blastocyste ne fut obtenu dans un premier travail (6). Lors d'une seconde manipulation, nous avons obtenu 3 blastocystes.

Récemment, Wang et coll. ont rapporté une amélioration de la survie folliculaire en après greffe hétérotopique sous la peau chez la souris en traitant les animaux avec des injections d'HMG (30). Israely et coll. ont eux démontré que les implants intramusculaires survivaient mieux que les implants sous-cutanés, grâce à une meilleure angiogénèse (31).

Oktay a rapporté le premier cas de greffe hétérotopique dans l'espèce humaine, sous la peau de l'avant-bras, avec du tissu frais (non congelé) ; il a obtenu une ovulation au sein du greffon et a ponctionné un ovocyte mature (32). L'autogreffe de tissu ovarien est très certainement un moyen fonctionnel chez la femme pour obtenir une maturation folliculaire post-décongélation. Le choix du lieu de la greffe reste néanmoins un vrai problème, la face interne de l'avant-bras comme le propose Oktay semble une possibilité.

La maturation folliculaire in vitro

La maturation in vitro de follicules ovariens décongelés serait une solution élégante pour obtenir des ovocytes matures, évitant aux patientes les aléas de l'autogreffe. Les techniques de culture des follicules ovariens en sont cependant encore à leur début. En raison du fait que seuls les follicules primordiaux survivent aux techniques de congélation-décongélation, le système de culture idéal serait celui permettant le développement des follicules du stade primordial jusqu'au stade pré-ovulatoire (15, 16). Actuellement, le développement folliculaire complet in vitro n'a pu être obtenu que chez la souris et avec un rendement extrêmement faible puisque seulement 2 souriceaux ont été obtenus, dont un seul vivant, après transfert de 190 embryons à 2 cellules dans les trompes de souris pseudo-gestantes (33). Par contre, dans le modèle murin, la culture folliculaire à partir de follicules pré-antraux a permis à plusieurs équipes d'obtenir des embryons et des jeunes (34-36). Dans aucune autre espèce, il n'a été obtenu de jeunes après culture folliculaire in vitro pour le moment.

En ce qui concerne la culture folliculaire dans l'espèce humaine, les difficultés sont liées à la longueur de la folliculogénèse (37) et à la grosseur du follicule pré-ovulatoire qui pose d'énormes problèmes techniques. Par ailleurs, s'il a été montré que la présence de gonadotrophines dans les milieux de culture améliorerait le développement folliculaire (38, 39), le peu de connaissances que nous avons, par exemple, sur la régulation paracrine de la folliculogénèse, donc des éléments indispensables à une bonne croissance folliculaire, pose des problèmes au niveau de l'élaboration de milieux de culture adaptés à la culture folliculaire *in vitro* (40). Les travaux sur la folliculogénèse *in vitro* dans l'espèce humaine ne sont pas très nombreux. Généralement, ce sont des systèmes de culture organotypiques qui permettent une culture en trois dimensions, conservant ainsi l'architecture folliculaire, qui ont été utilisés (38, 41-44). Différents stades folliculaires ont pu être cultivés *in vitro* avec une bonne survie folliculaire et obtention du stade folliculaire suivant. Une étape difficile dans le développement folliculaire est le passage follicule primordial au stade follicule primaire. La culture sur membrane de fragments ovariens permet d'assurer cette transition *in vitro* (43). Pour la culture de follicules préantraux, la technique la plus utilisée est aussi la culture sur membrane au sein de fines tranches d'ovaires. Elle a été pratiquée par la plupart des auteurs qui ont montré des résultats positifs en termes de croissance folliculaire, soit à partir d'ovaires adultes (41, 43, 44) ou à partir d'ovaires fœtaux (45, 46). Des follicules préantraux isolés ont pu être aussi cultivés soit sur membrane (38, 43) soit en boîte 4 puits (39). La formation de l'antrum est possible *in vitro* (38, 39). Baker en 1974 (41) a constaté que la culture de 5 jours de follicules à antrum était possible avec une bonne survie folliculaire pour certains et une dégénérescence pour d'autres. Après formation de l'antrum, le follicule dans son entier n'est plus nécessaire pour assurer le développement et la maturation ovocytaire. Il a été montré que la culture de complexes cumulo-ovocytaires provenant de petits follicules à antrum pouvait amener les ovocytes à maturation. Dans l'espèce humaine, la première maturation ovocytaire *in vitro* a été faite par Edwards en 1965 (47). C'est seulement en 1991 que Cha décrit la première naissance obtenue après maturation ovocytaire *in vitro* d'ovocytes immatures entourés du complexe cumulo-ovocytaire provenant d'ovaires non stimulés (48). Depuis, d'autres grossesses et naissances ont été rapportées (49, 50).

En conclusion, plusieurs étapes du développement folliculaire dans l'espèce humaine ont été obtenues *in vitro*. Ces résultats sont encore parcellaires mais encourageants. L'association des techniques permet-

tant le développement folliculaire du stade primordial jusqu'au stade antral et celles de maturation ovocytaire *in vitro* à partir de complexes cumulo-ovocytaires pourrait constituer une alternative intéressante à l'autogreffe de tissu ovarien.

La xénogreffe (51)

Le premier à avoir proposé la xénogreffe comme procédé de maturation folliculaire est Gosden et coll. en 1994 (52). Les auteurs ont greffé des fragments de cortex ovarien frais de chatte et de brebis sous la capsule rénale de souris SCID. Les greffons furent prélevés à 9 mois ; les auteurs notèrent une atésie post-greffe des follicules en croissance et ils estimèrent que les follicules développés à long terme provenaient des follicules primordiaux qui avaient survécu à la greffe. Les follicules les plus gros observés dans les greffons atteignaient 3 mm et le stade antral précoce. Aucune ovulation ne fut notée dans les greffons à 9 mois.

Après Gosden, plusieurs auteurs se sont intéressés à la xénogreffe (3, 10, 53-58) de tissu ovarien. À la vue de ces différentes publications, on peut tirer quelques conclusions (51) : plusieurs animaux immunodéficients sont utilisables pour recevoir des xénogreffes. Les souris SCID qui comportent à la fois un déficit en lymphocytes T et B semblent mieux adaptées théoriquement à la xénogreffe. Les souris nues ont cependant donné de bons résultats également, même si théoriquement elles devraient moins bien tolérer la xénogreffe. Les souris nues offrent par ailleurs l'avantage de nécessiter des conditions d'élevage beaucoup plus simples que les souris SCID. L'utilisation de souris NOD-SCID, proposée par Weissman et coll. (58) et Van den Broecke et coll. (59), offre l'avantage théorique d'un rejet de xénogreffe encore plus faible et donc probablement de meilleures garanties de survie à long terme des xénogreffes. La question de savoir s'il est nécessaire de castrer les souris receveuses se pose également, plusieurs auteurs notent de meilleurs résultats après castration (3, 60). Weissman ne note pas de gain à utiliser les agonistes du GnRH chez la souris non castrée, par contre la greffe chez la souris mâle semble mieux reprendre (58). Enfin signalons le modèle utilisé par Oktay de souris à la fois SCID et hypogonadiques qui a également donné de bons résultats (56). Des travaux sont encore nécessaires pour déterminer quel est le meilleur receveur pour les xénogreffes de tissus humains.

Les différents travaux réalisés retrouvent tous une survie folliculaire importante qui semble être meilleure dans les greffons réalisés sous la capsule rénale. La comparaison entre les greffons de tissu congelé et de tissu frais montre peu de différence, en termes de survie

folliculaire, ce qui laisse penser que la déperdition en follicules est plus le résultat de la greffe elle-même que de la cryopréservation.

La maturation folliculaire est bloquée pour la plupart des auteurs au stade 2 couches de cellules de la granulosa (2CCG) en l'absence de stimulation. Il semble cependant exister des différences dans certaines espèces puisque Candy (55) sur le Marmoset et Gunasena (57) sur l'éléphant obtiennent des follicules antraux en l'absence de toute stimulation. En ce qui concerne le tissu humain, l'adjonction de FSH ou d'hCG améliore la maturation jusqu'au stade antral ; en effet en l'absence de stimulation, certains auteurs n'obtiennent pas de follicules antraux (56) ou très peu (53, 59).

Cependant aucun auteur n'est arrivé à des follicules plus gros que 5 à 7 mm. Nous ne possédons pas de données sur les possibilités de maturation finale des follicules au sein des xénogreffes et donc sur la qualité des ovocytes ainsi produits. Ce point reste la question essentielle à éclaircir en matière de XTO. Enfin, aucun animal n'ayant encore été produit par XTO, la compétence des ovocytes ainsi maturés pour être fécondés reste inconnue ; enfin la normalité du produit de la fécondation doit également être prouvée, c'est dire que de nombreux travaux sont encore nécessaires.

S'il est possible un jour d'obtenir des grossesses grâce à la XTO, il s'agira là d'un modèle expérimental tout à fait passionnant, qui fait l'intérêt de la XTO. Envisager des applications cliniques à la XTO pose cependant un problème éthique majeur. Faire maturer un gamète humain dans un animal doit en effet être envisagé avec circonspection. Il est primordial de répondre à certaines questions :

- Quels sont les risques de transmission d'agent infectieux ? Ce vaste domaine ne peut pas trouver de réponse simple aujourd'hui car nous nous apercevons chaque jour que certains agents infectieux nous sont encore partiellement voire totalement inconnus ;

- Existe-t-il des risques d'altération du patrimoine génétique ? La réponse paraît clairement négative en xénogreffe d'organe ou de tissu banal, cependant les gamètes ne constituent pas un tissu banal. Il faudrait de très nombreuses preuves indiscutables de production d'animaux normaux par XTO avant de pouvoir envisager d'obtenir de la sorte un embryon humain, et même avec ces preuves en main, le pas restera difficile à franchir à nos yeux.

Un début de réflexion sur les problèmes éthiques semble s'amorcer (61, 62), mais nous sommes encore bien loin d'appréhender tous les problèmes que risque de nous poser la mise au point de la XTO.

Le transfert de noyau

Wang et coll. (63) ont proposé une idée intéressante qui pourrait être la solution de demain pour obtenir des ovocytes matures à partir du tissu ovarien congelé. L'idée est de prélever les noyaux des ovocytes décongelés au sein des follicules primordiaux et de les transférer dans des ovocytes matures énucléés, court-circuitant ainsi toute la phase de maturation folliculaire. Ces auteurs ont ainsi obtenu chez la souris un taux d'électrofusion nucléaire de 35,6 % dans des ovocytes énucléés matures (stade de vésicule germinale) et un taux d'exclusion du premier globule polaire de 52,8 %. Les ovocytes matures ainsi obtenus avaient une configuration du fuseau et un nombre de chromosomes normaux. Il s'agit là, bien sûr, de travaux préliminaires, mais qui offrent une nouvelle voie d'utilisation du tissu ovarien.

Quel que soit le mode d'obtention des ovocytes matures, il sera nécessaire de vérifier la normalité des animaux obtenus avec ces technologies avant de les proposer en application humaine. Ceci est le cas pour les animaux obtenus après autogreffe, mais nous n'avons pas d'idée précise des résultats que pourront donner la maturation *in vitro*, la xénogreffe ou le transfert de noyau. C'est dire que la route est encore longue avant que ces techniques ne soient proposées à nos patientes.

LES INDICATIONS DE LA CPTO

La cryopréservation du tissu ovarien (CPTO) n'a pas encore fait ses preuves en termes de grossesse dans l'espèce humaine ; il peut donc paraître prématuré d'envisager des indications à une technique non encore validée. Cependant, de nombreuses équipes à travers le monde ont commencé à prélever du tissu ovarien en situation clinique, faisant le pari qu'au moment de réutiliser le tissu de leur patiente, nous en saurions davantage sur la manière optimale d'utiliser ce tissu.

La CPTO offre de nombreuses possibilités théoriques dont certaines sont déjà à l'ordre du jour, tandis que d'autres ne sont envisageables qu'à moyen et à long terme. Poser l'indication d'une CPTO est donc une question d'actualité, lourde de conséquences, qui mérite d'ores et déjà une réflexion approfondie, pluridisciplinaire (64).

La population en cellules germinales d'une femme atteint son maximum vers 6 mois de vie intra-utérine. À la naissance, il n'existe déjà plus qu'un million de cellules germinales au sein des follicules primordiaux (65, 66). Cette réserve folliculaire est un capital précieux qui va s'amenuiser tout au long de la vie et qui, une fois perdu, ne peut être reconstitué. Le but essentiel de la CPTO est de préserver la fertilité de la patiente en protégeant son tissu ovarien des menaces qui pèsent sur la réserve folliculaire.

Trois types de menaces pèsent sur cette réserve. La première est la plus inéluctable, c'est celle du temps. À partir de la naissance (et même avant comme nous l'avons vu), la population folliculaire subit une décroissance exponentielle qui s'accélère vers 38 ans, la réserve étant pratiquement épuisée à la ménopause (65). Pendant toute la vie reproductive d'une patiente, environ 500 follicules seulement atteindront une maturation complète avec émission d'un ovocyte mature, le reste des follicules sera détruit par apoptose et atrophie folliculaire (67). La CPTO ne pourrait-elle pas constituer une alternative à cet énorme gaspillage ?

La seconde menace qui pèse sur le tissu ovarien est la destruction anormalement rapide du stock folliculaire que l'on rencontre dans certaines situations pathologiques responsables de ménopauses précoces. D'autre part il est parfois nécessaire, quand l'ovaire est lui-même atteint ou susceptible de l'être par un processus tumoral, d'enlever chirurgicalement une partie plus ou moins grande du tissu ovarien. Toute ablation du tissu ovarien aboutit également à une diminution du stock folliculaire.

Enfin la troisième menace pour le tissu ovarien est iatrogène, plus particulièrement chez les patientes qui doivent subir un traitement anticancéreux. Deux des principales armes contre le cancer sont la radiothérapie et la chimiothérapie. Ces deux types de thérapeutiques sont très délétères pour les cellules germinales (68) et doivent être parfois largement utilisées chez des jeunes femmes voire des enfants. La CPTO pourrait alors nous permettre de protéger efficacement la réserve folliculaire.

Les situations pathologiques qui menacent le stock folliculaire

Certaines anomalies chromosomiques notamment au niveau du chromosome X, comme le syndrome de Turner complet et en mosaïque ou des délétions, des inversions... exposent à une ménopause précoce. On observe également un épuisement anormalement

précoce des follicules dans les galactosémies congénitales, certaines maladies auto-immunes (69) et certaines maladies infectieuses (70).

Dans quelques-unes de ces situations, il est parfois possible de prédire une ménopause prématurée et il est donc théoriquement possible de prélever du tissu ovarien chez ces patientes pour pouvoir l'utiliser au cas où elles souhaiteraient des maternités tardives (69, 71). Il serait nécessaire de réaliser ce prélèvement le plus tôt possible car le stock folliculaire décroît très vite dans ces situations. La difficulté majeure serait d'estimer précisément le risque de ménopause précoce et à quel âge elle surviendrait. En pratique il est très difficile d'estimer ce risque et, dans l'état actuel des choses, il nous semble encore prématuré de proposer cette indication pour la CPTO car nous pourrions faire perdre à ces patientes les faibles chances de maternité spontanée qui existent parfois chez elles.

Il y a d'autres situations où la réserve folliculaire est prématurément compromise ; il s'agit des situations où il est nécessaire d'enlever chirurgicalement tout ou partie du tissu ovarien, comme par exemple dans les tumeurs ovariennes. Le cancer épithélial de l'ovaire survient rarement chez la jeune femme en âge de procréer, mais les tumeurs *borderlines*, les tumeurs germinales et stromales de l'ovaire sont au contraire fréquentes chez la femme jeune ou l'enfant. Dans ces pathologies ovariennes, il est souvent nécessaire de recourir à une ovariectomie parfois bilatérale. Il peut être intéressant de congeler ce cortex ovarien d'apparence saine, qui de toute façon serait perdu pour la patiente. Le choix du cortex à congeler doit être fait en présence du médecin anatomo-pathologiste. Toute zone lui paraissant suspecte doit lui être confiée ainsi que la totalité de la médullaire. Chez les patientes porteuses des mutations géniques exposant au cancer de l'ovaire, la CPTO pourrait également être une possibilité de préserver la fertilité tout en diminuant le risque de cancer ovarien.

Les menaces iatrogènes pour la réserve folliculaire

On sait que les rayons X détruisent les follicules primordiaux de manière dose dépendante, il en est de même pour les agents alkylants utilisés en chimiothérapie (72). La CPTO avant ce type de traitement protégerait le stock folliculaire des patientes et éviterait également leur effet mutagène sur les cellules germinales (73). Les procédés que nous utilisons habituellement dans ces situations, qui sont la transposition ovarienne ou la congélation d'embryon ou d'ovocyte, sont souvent insuffisants ou inadaptés. Par ailleurs ces autres possibilités n'excluent

en rien la CPTO : on peut imaginer dans certaines situations d'associer la transposition d'un ovaire et la CPTO de l'autre, ou de réaliser une CPTO après une induction d'ovulation pour cryopréserver des embryons ou des ovocytes matures.

Dans l'état actuel des choses, il nous semble prudent de réserver la CPTO aux patientes qui, de toute façon, n'ont rien à perdre car les traitements qui leur seront proposés vont les ménopausier ou au moins amputer énormément leur réserve folliculaire. Il s'agit des patientes qui vont subir une irradiation corporelle totale, une chimiothérapie par agents alkylants à doses importantes ou une association radiothérapie pelvienne-chimiothérapie.

En pratique, ces situations se rencontrent dans certaines tumeurs solides de l'enfant, telles que le néphroblastome, le rhabdomyosarcome, le sarcome d'Ewing, le médulloblastome. Chez l'adulte, les tumeurs du sein, de l'ovaire ou du col utérin de la femme jeune entrent parfois dans cette catégorie. À tout âge, le traitement des hémopathies malignes peut être source de destruction du stock folliculaire (74). Pour ce qui est des leucémies aiguës, le risque de maladie ovarienne résiduelle est grand et le risque de transmission de cellules malignes par autogreffe semble réel ; il serait donc plus logique de prélever le tissu ovarien en phase de rémission avant une intensification thérapeutique par exemple. Même au prix de ces précautions, l'autogreffe ne serait pas dénuée de risque. Par contre, pour d'autres hémopathies comme la maladie de Hodgkin, le risque de maladie ovarienne résiduelle est très faible (75).

Une autre catégorie de pathologies non malignes pourrait également bénéficier de la CPTO, il s'agit de toutes les maladies dont le traitement comporte l'utilisation des agents alkylants au long cours. Il s'agit de certaines thalassémies, de lupus érythémateux, de syndromes néphrotiques, de périartérites noueuses... Dès lors par exemple que la dose totale de cyclophosphamide dépasse 10 g, il est licite de penser à la CPTO.

PROBLEMES LÉGISLATIFS ET ÉTHIQUES

Le stockage du tissu

Le tissu ovarien congelé doit être stocké avant son utilisation, et ceci souvent pour une très longue période. En France, les gamètes sont

stockés dans les CECOS et les tissus dans les banques de tissus. En ce qui concerne le tissu ovarien, le débat reste ouvert, il s'agit d'un tissu qui contient de futurs gamètes. Pour le moment, en l'absence de recommandations législatives, chaque équipe stocke le tissu où elle le désire, le plus souvent dans les CECOS. Le même débat se pose dans d'autres pays (76, 77). Quoi qu'il en soit, les contraintes sanitaires de ce stockage pour une très longue période doivent être drastiques.

Le problème de l'âge

Pour la CPTO, l'âge des patientes est un facteur déterminant. Il est vraisemblable que les prélèvements de tissu ovarien au-delà de 35 ans sont inutiles. En effet, à cet âge, la population folliculaire est déjà largement réduite (65, 78) et la perte additionnelle engendrée par le processus de la cryopréservation rendrait le tissu trop pauvre en follicules pour espérer obtenir des grossesses dans l'état actuel de ce que nous pouvons faire.

Par opposition, chez l'enfant, la CPTO est une technique très intéressante car l'ovaire contient alors beaucoup de follicules primordiaux et les prélèvements permettront le stockage d'un nombre important de follicules. Notons par ailleurs que, chez l'enfant, les procédés alternatifs que sont la cryopréservation de l'ovocyte ou de l'embryon sont impossibles. Enfin rappelons que les enfants n'auront besoin de leur tissu ovarien que dans de nombreuses années voire quelques décennies, on peut espérer alors savoir utiliser le tissu prélevé de manière optimale. Pour toutes ces raisons, ce sont les enfants qui pourraient bénéficier au mieux de la CPTO.

Le problème de la quantité de tissu à collecter

Quand une décision de prélèvement de tissu ovarien est prise, la première question à laquelle il faut répondre est : quelle quantité de tissu faut-il prélever ? Prendre la décision de prélever le tissu ovarien d'une patiente est lourd de conséquences, surtout pour une technique qui n'a pas encore fait la preuve de son efficacité dans l'espèce humaine en termes de grossesse. Par ailleurs, même après des traitements réputés totalement castrateurs, certaines grossesses peuvent survenir à cause des grandes variations de susceptibilité individuelle. Il est donc souvent difficile d'affirmer qu'une patiente sera définitivement castrée par ses traitements anticancéreux (72). Ces différents

arguments font que l'on est tenté d'être économe sur la quantité de tissu prélevé, pour laisser d'éventuelles chances de grossesses spontanées aux patientes.

À l'opposé, il est nécessaire de disposer d'une quantité de tissu assez importante pour espérer obtenir des grossesses ; on sait que de larges zones de cortex ovarien peuvent être dépourvues de follicules primordiaux, surtout chez la femme au-delà de la trentaine (78). Par ailleurs, même si les données dans l'espèce humaine ne sont pas disponibles, les travaux expérimentaux chez l'animal montre que les greffons peuvent s'épuiser assez rapidement (6, 27). Le prélèvement doit donc être suffisamment important pour stocker assez de follicules et garder un espoir raisonnable de grossesse.

En pratique, nous avons donc pris l'habitude de prélever un ovaire chez l'adulte ; il s'agit d'un compromis permettant de laisser une chance de grossesse spontanée tout en stockant un nombre important de follicules. Chez l'enfant, il est possible d'être encore plus économe, et le prélèvement d'un demi-ovaire procure un nombre important de follicules.

Le devoir d'information des patientes

Comme nous l'avons souligné à plusieurs reprises, la CPTO n'a pas encore fait ses preuves dans l'espèce humaine ; il est donc inconcevable de la considérer comme une méthode validée, utilisable en routine. Il est indispensable d'informer loyalement les patientes des limites de cette méthode et des autres procédés qui pourraient lui être proposés. La décision de réaliser une CPTO doit donc être prise conjointement entre la patiente et l'équipe soignante (61, 79). Cette information est particulièrement difficile à fournir aux enfants qui sont, comme nous l'avons vu, les principaux bénéficiaires potentiels de la CPTO. Les parents doivent bien sûr être totalement informés et impliqués dans la démarche.

Les recommandations en France sont de réaliser la CPTO sous couvert des lois Huriez régissant la recherche clinique. Plusieurs protocoles sont ainsi déposés dans notre pays pour réaliser la CPTO.

En conclusion, nous pensons qu'il existe déjà des circonstances où la CPTO peut être proposée aux patientes. Ces situations restent rares, chaque indication nécessitant une évaluation minutieuse de ce que peut apporter la CPTO comparativement aux autres techniques utilisables ou à l'abstention thérapeutique. Cette évaluation doit être multidisciplinaire, et la patiente parfaitement informée.

LA CRYOPRÉSERVATION DU TISSU OVARIEN

Insistons sur la nécessité de poursuivre les travaux de recherche sur les manières d'utiliser le tissu ovarien cryopréservé.

Il ne faut enfin pas perdre de vue que l'intérêt de la CPTO est contextuel. Si un jour il est possible de soigner le cancer sans détruire les cellules germinales, la CPTO aura perdu l'une de ses principales indications.

Bibliographie

1. Meiorow D, Fasoulitis SJ, Nugent D, Schenker JG, Gosden RG, Rutherford AJ. A laparoscopic technique for obtaining ovarian cortical biopsy specimens for fertility conservation in patients with cancer. *Fertil Steril* 1999; 71: 948-951.
2. Oktay K, Nugent D, Newton H, Salha O, Chatterjee P, Gosden RG. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril* 1997; 67: 481-486.
3. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden RG. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996; 11: 1487-1491.
4. Gosden RG. Restitution of fertility in sterilized mice by transferring primordial ovarian follicles. *Hum Reprod* 1990; 5: 499-504.
5. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at - 196°C. *Hum Reprod* 1994; 9: 597-603.
6. Aubard Y, Piver P, Cognié Y, Fermeaux V, Poulin N, Driancourt MA. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. *Hum Reprod* 1999; 14: 2149-2154.
7. Aubard Y, Newton H, Scheffer G, Gosden R. Conservation of the follicular population in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 79(1): 83-7.
8. Aubard Y, Lavignac MP, Grandjean MH, Piver P, Teissier MP. Autogreffes orthotopiques de fragments ovariens chez le rat avec grossesses. *Contr Fertil Sexual* 1996; 24: 852-855.
9. Gook AD, Edgar DH, Stern C. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1,2-propanediol. *Hum Reprod* 1999; 14: 2061-2068.
10. Oktay K, Newton H, Gosden R. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth. *Fertil Steril* 2000; 73: 599-603.
11. Imhof M, Hofstetter G, Bergmeister H, Rudas M, Kain R, Wenzl R, Huber JC. Ovarian tissue banking - primary results. *Gynakol Geburt Rund* 1999; 39: 210-212.
12. Wang X, Chen H, Yin H, Kim SS, Lin Tan S, Gosden RG. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 2002; 415: 385.
13. Yin H, Wang X, Kim SS, Chen H, Tan SL, Gosden RG. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod* 2003; 18: 1165-1172.
14. Parkes AS, Smith AU. Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperature. *Proc Roy Soc* 1953; 14: 455-470.
15. Parkes AS. Factors affecting the viability of frozen ovarian tissue. *J Endocrinol* 1958; 17: 337-340.
16. Deanesly R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *J Endocrinol* 1954; 11: 197-200.
17. Green SH, Smith AU, Zuckerman S. The number of oocytes in ovarian autografts after freezing and thawing. *J Endocrinol* 1956; 13: 330-345.
18. Parrott DMV. The fertility of mice with orthotopic ovarian graft derived from frozen tissue. *J Reprod Fert* 1960; 1: 230-241.
19. Gosden RG, Aubard Y. *Transplantation of Ovarian and Testicular tissues*. Austin (Texas): Landes, R G; 1996.
20. Tokieda Y, Ishiwata I, Segino M, Ishikawa H, Sato K. Establishment of a novel method for cryopreservation and thawing of the mouse ovary. *Hum Cell* 2002; 15: 230-237.
21. Isachenko E, Isachenko V, Rahimi G, Nawroth F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 108: 186-193.
22. Aubard Y, Teissier MP, Baudet JH. Greffes et transplantations ovariennes chez la femme : le point. *Rev Fr Gynécol Obstét* 1993; 88: 583-590.
23. Gunasena KT, Villines PM, Crister ES, Crister JK. Live birth after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod*

1997; 12: 101-106.

24. Aubard Y, Newton H, Piver P, Clavère P, Fermeaux V, Gosden RG. The preservation of the follicular population and fertility in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue. In: Gomel V, Leung PCK, editors. 10 th World Congress of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction; 1997 24-28 May; Vancouver (Canada): Monduzzi Editore; 1997. p. 99-103.

25. Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz RC, Guerin JF, Lornage J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil Steril* 2002; 77: 403-408.

26. Gutierrez Gutierrez A, Vargas Aguirre MA, Corona Martha A, Becerra E, Gonzalez Ortega C, Mendoza Hurtado S, Monroy Avendano E, Tovar Caballero G. Gestation in sheep after autotransplantation with cryopreserved ovarian tissue: evidence for oocyte viability after freezing and transplantation procedures. *Ginecol Obstet Mex* 2003; 71: 5-11.

27. 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. *Endocrinology* 1999; 140: 462-471.

28. Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Eng J Med* 2000; 342: 1919.

29. Radford JA, Lieberman BA, Brison DR, Smith ARB, Critchlow JD, Russell SA, Watson AJ, Clayton JA, Harris M, Gosden R, Shalet SM. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 2001; 357: 1172-1175.

30. Wang H, Mooney S, Wen Y, Behr B, Polan ML. Follicle development in grafted mouse ovaries after cryopreservation and subcutaneous transplantation. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 370-374.

31. Israely T, Dafni H, Granot D, Nevo N, Tsafiri A, Neeman M. Vascular remodeling and angiogenesis in ectopic ovarian transplants: crucial role of pericytes and vascular smooth muscle cells in maintenance of ovarian grafts. *Biol Reprod* 2003; 68: 2055-2064.

32. Oktay K, Aydin BA, Economos K, Rucinski J. Restoration of ovarian function after

autologous transplantation of human ovarian tissue in the forearm. *Fertil Steril* 2000; 74: S90 - S91.

33. Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol. Reprod* 1996; 54: 197-207.

34. Eppig JJ, Schroeder AC. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilisation in vitro. *Biol Reprod* 1989; 41: 268-276.

35. Spears N, Boland NI, Murray AA, Gosden RG. Mouse oocytes derived from in vitro grown primary ovarian follicles are fertile. *Hum Reprod* 1994; 9: 527-532.

36. Cortvindt R, Smits J, Van Steirteghem A. In vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod* 1996; 11: 2656-2666.

37. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1986; 1: 81-87.

38. Abir R, Franks S, Mobberley M. Mechanical isolation and in vitro growth of preantral and small antral human follicles. *Fertil Steril* 1997; 68: 682-688.

39. Wu J, Zhang L, Liu P. A new source of human oocytes : preliminary report on the identification and maturation of human preantral follicles from follicular aspirates. *Hum Reprod* 1998; 13: 2561-2563.

40. Erickson GF, Danforth DR. Ovarian control of follicle development. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 736-749.

41. Baker TG, Neal P. Organ culture of cortical fragment and Graafian follicles from human ovaries. *J Anat* 1974; 2: 361-371.

42. Roy S, Treacy B. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril* 1993; 59: 783-790.

43. Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RL. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long term culture. *Hum Reprod* 1997; 12: 1032-1036.

44. Wright CS, Hovatta O, Margara R. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of ovarian follicles. *Hum Reprod* 1999; 14: 1555-1562.

45. Zhang J, Liu J, Xu P. Extracorporeal

- development and ultrarapid freezing of human fetal ova. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12: 361-368.
46. Hartshorne G, Barlow A, Child T. Immunocytogenetic detection of normal and abnormal oocytes in human fetal ovarian tissue in culture. *Hum Reprod* 1999; 14: 172-182.
47. Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet* 1965; 2: 926-929.
48. Cha K, Koo J, Ko J, Choi D, Han S, Yoon T. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991; 55: 109-113.
49. Cha K, Han S, Chung H, Choi D, Lim J, Lee W, Ko J, Yoon T. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73: 978-983.
50. Hwang JL, Lin YH, Tsai YL. Pregnancy after immature oocyte donation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1997; 68: 1139-1140.
51. Aubard Y. Ovarian tissue xenografting. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 108: 14-18.
52. Gosden RG, Boulton MI, Grant K, Webb R. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *J Reprod Fertil* 1994; 101: 619-623.
53. Gook DA, McCully BA, Edgar DH, McBain JC. Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 2001; 16: 417-422.
54. Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J, Motta P, Donnez J. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril* 2000; 74: 122-129.
55. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Hum Reprod* 1995; 10: 2334-2338.
56. 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: 1133-1138.
57. Gunasena KT, Lakey JR, Villines PM, Bush M, Raath C, Critser ES, McGann LE, Critser JK. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved african elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. *Anim Reprod Sci* 1998; 53: 265-275.
58. Weissman A, Gotlieb L, Colgan T, Jurisicova A, Greenblatt EM, Casper RF. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. *Biol Reprod* 1999; 60: 1462-1467.
59. Van den Broecke R, Liu J, Van der Elst JC, Dhont M. Timing of FSH-stimulation and development in cryopreserved human ovarian grafts. *Reprod Biomed Online* 2002; 4: 21-26.
60. Gunasena KT, Lakey JRT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Allogenic and xenogenic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. *Biol Reprod* 1997; 57: 226-231.
61. Robertson JA. Ethical issues in ovarian transplantation and donation. *Fertil Steril* 2000; 73: 443-446.
62. Aubard Y. More to ovarian transplantation then meets the eye. *Fertil Steril* 2000; 74: 423-424.
63. Wang CW, Lai YM, Chan PR, Horng SG, Chang CL, Chen CK, Wu HM, Huang HY, Wang H, Soong YK. Resumption of meiosis-I tissue to enucleated prerovulatory oocytes: a preliminary report. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 493-499.
64. Aubard Y, Poirot C, Piver P, Galinat S, Teissier MP. Are there indications for ovarian tissue cryopreservation ? *Fertil Steril* 2001; 76(2): 414-415.
65. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life - Implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992; 7: 1342-1346.
66. Faddy MJ, Gosden RG. A mathematical model for follicle dynamics in human ovaries. *Hum Reprod* 1995; 10: 770-775.
67. Gosden RG, Spears N. Programed cell death in the reproductive system. *Brit Med Bull* 1997; 53: 644-661.
68. Marmor D. Effets gonadiques de la radiothérapie et de la chimiothérapie. In: Aubard Y, Olivennes F, editors. *Fertilité après traitements anticancéreux*. Paris: Masson; 1999. p. 3-24.
69. Kauffman RP, Castracane VD. Premature

LA CRYOPRÉSERVATION DU TISSU OVARIEN

ovarian failure associated with autoimmune polyglandular syndrome: pathophysiological mechanisms and future fertility. *J Womens Health (Larchmt)* 2003; 12: 513-520.

70. Anasti JN. Premature ovarian failure: an update. *Fertil Steril* 1998; 70: 1-15.

71. Hreinsson JG, Ojala M, Fridstrom M, Borgstrom B, Rasmussen C, Lundqvist M, Tuuri T, Simberg N, Mikkola M, Dunkel L, Hovatta O. Follicles are found in the ovaries of adolescent girls with Turner's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3618-3623.

72. Aubard Y. Fertilité après chimiothérapie anticancéreuse. In: SAS E, editor. *Encyc Méd Chir*. Paris; 2002. p. 1-11.

73. Donnez J, Bassil S. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 248-259.

74. Chatterjee R, Kottaridis PD. Treatment of gonadal damage in recipients of allogenic or autologous transplantation for haematological malignancies. *Bon Mar Transpl* 2002; 30: 629-635.

75. Meirou D, Ben Yehuda D, Prus D,

Poliack A, Schenker JG, Rachmilewitz EA, Lewin A. Ovarian tissue banking in patients with Hodgkin's disease: is it safe? *Fertil Steril* 1998; 69: 996-998.

76. Bahadur G, Whelan J, Davies MC, Ralph D. Cancer patients, gametes, gonadal tissue, and the UK legal status. *Reprod Biomed Online* 2001; 2: 8-10.

77. Hartshorne G. Future regulation of fertility banking in the UK. *Hum Fertil (Camb)* 2003; 6: 71-73.

78. Schmidt KL, Byskov AG, Nyboe Andersen A, Muller 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: 1158-1164.

79. Van den Broecke R, Pennings G, Van der Elst JC, Liu J, Dhont M. Ovarian tissue cryopreservation: therapeutic prospects and ethical reflections. *Reprod Biomed Online* 2001; 3: 179-184.