

CRYO-PRÉSERVATION DU TISSU OVARIEN CHEZ DES PATIENTES DEVANT BÉNÉFICIER D'UNE CHIMIOTHÉRAPIE

M.-M. DOLMANS,
J. DONNEZ¹

Correspondance :
Dr. M.-M. Dolmans,
Université catholique de Louvain
Cliniques universitaires Saint-Luc
Service de Gynécologie, Avenue Hippocrate 10,
1200 Bruxelles, Belgique

Mots-clefs : fertilité, chimiothérapie, cortex ovarien,
cryopréservation, transplantation, greffe

SUMMARY

Progress in cancer therapy have resulted in an increased number of long-term cancer survivors. Unfortunately, aggressive chemotherapy, ionizing radiotherapy and bone marrow transplantation can severely affect the ovarian follicular store and subsequently lead to a loss of fertility and premature menopause.

The different options available for fertility preservation in cancer patients are embryo cryopreservation, oocyte cryopreservation and ovarian tissue cryopreservation. The choice depends on various parameters: the type and timing of chemotherapy, the type of cancer, the patient's age and the partner status. Most female cancer patients of reproductive age do not have the option of utilizing established assisted reproductive technologies as embryo cryopreservation to safeguard their fertility. Indeed, in many cancers, chemotherapy is initiated soon after diagnosis. A promising alternative to prevent fertility loss in these patients is the cryopreservation and transplantation of ovarian tissue. With the latest advances in cryobiology, ovarian tissue cryopreservation is rapidly becoming a more widely offered technique by many medical centers around the world. The indications now extend beyond cancer, as gonadotoxic chemotherapy is being used in a number of benign systemic diseases as well.

Recent advances in orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue signal a promising future for ovarian tissue cryobanking. However, there are still many unresolved issues related to these technologies. Safeguarding patients from cancer cell reintroduction as well as minimizing ischemic tissue damage are critical issues for the successful clinical application of ovarian tissue cryobanking.

Our objective is to offer young patients at risk of premature ovarian failure after gonadotoxic treatment, realistic and safe fertility preservation options. In order to propose the most suitable transplantation procedure in each clinical situation (type of cancer, patient's age, risk of transmission), we focus now research on cryopreservation of entire ovary with its vascular pedicle, reducing follicular loss due to ischemia, and on isolation and transplantation of ovarian follicles, in order to avoid transmission of malignant cells through the graft.

¹ Université catholique de Louvain, Cliniques universitaires Saint-Luc, Service de Gynécologie, Chef de service, B-1200 Bruxelles



Grâce aux progrès récents dans le domaine oncologique, l'espérance de vie des jeunes patientes atteintes d'un cancer a fortement augmenté. Malheureusement, selon leur agressivité, les traitements chimio- et/ou radiothérapeutiques peuvent causer une défaillance ovarienne précoce et une perte irréversible de la fertilité, entraînant des effets majeurs sur la qualité de vie à long terme des patientes. Plusieurs options permettent de préserver la fertilité chez les patientes dont la réserve ovarienne est menacée: la cryopréservation des embryons, la cryopréservation des ovocytes ou la cryopréservation du tissu ovarien. Le choix dépend de plusieurs paramètres : le type et l'urgence de la chimiothérapie, le type de cancer, l'âge de la patiente et la présence ou non d'un partenaire. Souvent, l'urgence du traitement ne permet pas le délai nécessaire à la stimulation ovarienne et la congélation d'embryons ou d'ovocytes est donc impossible. La seule option pour préserver la fertilité des jeunes filles prépubères ou des patientes qui doivent subir un traitement anti-cancéreux en urgence, est la congélation et la transplantation de tissu ovarien.

Grâce aux progrès dans le domaine des techniques de cryopréservation, la congélation du tissu ovarien est actuellement proposée par de nombreux centres. Les indications comprennent tant des pathologies malignes que des pathologies bénignes requérant de la chimiothérapie. Les premiers succès récents de transplantation orthotopique de tissu ovarien sont un espoir pour toutes ces patientes. Cependant, la recherche tente encore de répondre à des questions importantes telles le risque de réintroduction de cellules malignes via le greffon et la perte folliculaire post-transplantation au sein du greffon. Afin de pouvoir offrir à chaque patiente l'option la plus appropriée en fonction de l'âge, la pathologie et le risque de transmission, nos recherches portent sur la transplantation d'ovaire entier avec pédicule vasculaire et la transplantation de follicules isolés.

INTRODUCTION

Grâce aux progrès récents dans le domaine oncologique, l'espérance de vie des jeunes patientes atteintes d'un cancer a fortement augmenté. Malheureusement, selon leur agressivité, les traitements chimio- et/ou radiothérapeutiques peuvent causer une défaillance ovarienne précoce et une perte irréversible de la fertilité, entraînant des effets majeurs sur la qualité de vie à long terme des patientes. En effet, les ovaires sont très sensibles aux effets des traitements cytotoxiques, dont les plus gonadotoxiques sont les agents alkylants (par ex. cyclophosphamide, busulfan) (tableau I). Les dérivés des platines font partie de la catégorie à moyen risque et les agents tels le méthotrexate, le 5-FU et les alcaloïdes sont considérés comme faiblement gonadotoxiques (1). Le type de chimiothérapie et la dose reçue ainsi que l'âge de la patiente déterminent le risque de ménopause précoce. Celui-ci est bien sûr augmenté en cas d'association à de la radiothérapie, en particulier les irradiations pelviennes et les irradiations corporelles totales (2). Une dose de 5 à 20 Gy administrée aux ovaires est suffisante pour provoquer une ménopause précoce, quel que soit l'âge de la patiente (3). La dose d'irradiation qui détruit 50% de la réserve ovocytaire est aussi faible que <2 Gy (4).

OPTIONS PERMETTANT DE PRÉSERVER LA FERTILITÉ CHEZ LA FEMME

Plusieurs options permettent de préserver la fertilité chez les patientes dont la population germinale est menacée: la cryopréservation des embryons, la cryopréservation des ovocytes ou la cryopréservation du tissu ovarien (2,5-7). Le choix dépend de plusieurs paramètres : le type et l'urgence de la chimiothérapie, le type de cancer, l'âge de la patiente et la présence ou non d'un partenaire.

La cryopréservation d'embryons

La récolte d'ovocytes et la fécondation in vitro avec congélation des embryons est la seule solution que l'on puisse offrir dans le cadre de la pratique clinique courante. Néanmoins, elle entraîne bien souvent un délai inacceptable dans le traitement du cancer dû à la stimulation ovarienne. De plus, elle nécessite un partenaire, ce qui n'est souvent pas le cas chez les patientes jeunes.

La cryopréservation d'ovocytes

La cryopréservation d'ovocytes est réalisable chez des patientes pubères qui n'ont pas de partenaire. Cependant, les ovocytes matures résistent mal à la congélation (8) et les taux de succès de la technique sont faibles avec des taux de grossesse et de naissance se situant entre 1 et 5% par ovocyte congelé (9).

La cryopréservation de tissu ovarien

La cryopréservation du cortex ovarien présente l'avantage de pouvoir être appliquée sans délai et de permettre une bonne survie ovocytaire. Elle ne nécessite pas de recourir à la stimulation ovarienne et peut donc être proposée à des filles prépubères.

La grande majorité des follicules présents dans le cortex ovarien sont des follicules primordiaux, qui résistent bien à la congélation. Cependant, ces follicules primordiaux contiennent des ovocytes immatures et non encore fécondables. Afin de permettre la restauration de la fertilité après décongélation du tissu ovarien, il est donc nécessaire de faire croître et mûrir ces follicules afin d'obtenir des ovocytes matures pour la fécondation. Ceci peut se réaliser soit par culture de follicules in vitro soit par greffe de tissu ovarien.

TABLEAU I
AGENTS CYTOTOXIQUES CLASSÉS SUIVANT LEUR DEGRÉ DE GONADOTOXICITÉ

Risque élevé	Risque moyen	Risque faible
Busulfan	Doxorubicine	Actinomycine D
Chlorambucil	Carboplatine	Bleomycine
Cyclophosphamide	Cisplatine	5-Fluorouracile
Dacarbazine		Méthotrexate
Melphalan		Vincristine
Procarbazine		

INDICATIONS DE CRYO-PRÉSERVATION DE TISSU OVARIEN

En ce qui concerne les indications malignes de cryopréservation de tissu ovarien, il n'y a pas eu de modifications majeures depuis notre article de synthèse publié en 1998 (10). Ces indications sont reprises au tableau II. Une approche conservatrice en cas de chirurgie gynécologique maligne n'est envisageable qu'en cas de stade précoce de cancer du col, de la vulve, de l'endomètre ou de certains cas de carcinomes ovariens (stade IA) ainsi que pour les tumeurs ovariennes borderline. Le potentiel de fertilité est ensuite conditionné par les traitements adjuvants, tels la radio- et/ou chimiothérapie.

La greffe de moelle osseuse est le traitement qui entraîne les plus hauts taux de ménopause précoce. En effet, la chimiothérapie intensive (souvent à base d'agents alkylants tels cyclophosphamide/busulfan) et/ou l'irradiation corporelle totale nécessaires pour ce type de traitement entraînent une destruction de la réserve ovarienne dans quasi tous les cas, indépendamment de l'âge de la patiente (11-12). L'étude de Meirou et Nugent (13) rapporte un risque de ménopause précoce de 92%, et celle de Teinturier *et al.* (14) de 100% en cas d'utilisation de busulfan avant greffe de moelle. Une large étude rétrospective comprenant 37362 patientes ayant bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques ou de greffe de moelle rapporte un taux de grossesse de 0,6% (15).

Les indications de cryopréservation de tissu ovarien s'étendent au-delà des pathologies malignes puisque la greffe de cellules souches hématopoïétiques est utilisée dans le traitement de nombreuses maladies bénignes comme certaines maladies hématologiques (drépanocytose, thalassémie majeure et anémie aplastique) et auto-immunes (lupus érythémateux disséminé, thrombocytopenie auto-immune ne répondant pas aux traitements immunosuppresseurs) (16). D'autres pathologies bénignes comme l'endométriose ovarienne sévère et les kystes mucineux récidivants sont aussi des indications de cryopréservation de tissu ovarien. Les patientes devant subir une ovariectomie bilatérale prophylactique ou celles avec une histoire de ménopause familiale précoce peuvent aussi bénéficier d'une cryopréservation de tissu ovarien. Les indications de cryopréservation de tissu ovarien en cas de pathologie bénigne sont reprises dans le tableau II.

TABLEAU II

Indications de cryopréservation de tissu ovarien en cas de pathologie maligne

Pathologies extra-pelviennes

- Cancer osseux (ostéosarcome – sarcome d'Ewing)
- Cancer du sein
- Mélanome
- Neuroblastome
- Néoplasie intestinale

Pathologies pelviennes

- Néoplasies non-gynécologiques
 - Sarcome pelvien
 - Rhabdomyosarcome
 - Tumeurs recto-sigmoïdiennes
- Néoplasies gynécologiques
 - Stade précoce du cancer col
 - Stade précoce du carcinome vulvaire/vaginal
 - Certains cas de carcinomes ovariens (stade IA)
 - Tumeurs ovariennes borderline

Pathologies systémiques

- Maladie de Hodgkin
- Lymphome non-hodgkinien
- Leucémie
- Médulloblastome

Indications de cryopréservation de tissu ovarien en cas de pathologie bénigne

Ovariectomie uni/bilatérale

- Tumeurs ovariennes bénignes récidivantes
- Endométriose sévère
- Porteuses de la mutation BRCA-1 or BRCA-2

Risque de ménopause précoce

- Syndrome de Turner
- Ménopause familiale précoce
- Maladies bénignes nécessitant de la chimiothérapie: maladies auto-immunes (lupus érythémateux disséminé, arthrite rhumatoïde, maladie de Behcet, Wegener)

Transplantation de moelle

- Maladies hématologiques (drépanocytose, thalassémie majeure, anémie aplastique)

GREFFE DE TISSU OVARIEN CRYOPRÉSERVÉ

Afin de permettre la restauration de la fertilité après décongélation du tissu ovarien, deux approches sont envisagées: la greffe de tissu ovarien et la culture de follicules *in vitro*.

Les techniques de *culture de tissu ovarien* avec maturation folliculaire *in vitro* ont prouvé leur efficacité chez la souris (17) - avec cependant encore un rendement extrêmement faible- mais elles ne sont pas du tout au point pour l'espèce humaine. Les difficultés sont liées entre autre à la longueur du développement folliculaire humain qui pose d'énormes problèmes techniques (18).

La greffe de tissu ovarien est un modèle expérimental qui a fait ses preuves depuis de nombreuses années dans différentes espèces. On sait en effet qu'il n'est pas besoin d'anastomoses vasculaires pour que les greffons survivent car la néovascularisation qui apparaît est suffisante pour assurer la survie et la croissance d'au moins une partie des follicules primordiaux.

L'approche de greffe de tissu cortical est actuellement la plus prometteuse. Le choix du site de ces autogreffes est très important et de très nombreux sites ont été testés dans de nombreuses espèces. Si l'on réimplante le tissu dans sa situation princeps (greffe orthotopique), on peut espérer une fertilité naturelle et une grossesse spontanée. On peut également imaginer la réimplantation dans un autre site (greffe hétérotopique), mais ce type de greffe nécessite le recours à la fécondation *in vitro* pour obtenir une grossesse (19). L'autotransplantation de tissu ovarien cryopréservé a été décrite chez l'humain en orthotopique et en hétérotopique (pour synthèse, cf. 2).

Notre équipe a obtenu la toute première naissance après greffe orthotopique de tissu cortical ovarien décongelé chez une patiente après guérison d'un lymphome Hodgkinien (20). Depuis 2004, ce succès a été confirmé dans le monde par trois autres naissances (21-23) ainsi qu'une grossesse clinique avec fausse couche (24) et une grossesse biochimique (25).

Le protocole visant à évaluer les potentialités et les risques liés à cryopréservation ovarienne a été accepté en 1995 par le comité d'éthique de l'UCL. Depuis lors, plus de 250 patientes ont bénéficié d'une cryopréservation ovarienne avant traitement chimiothérapique dans notre service, ce qui fait de la banque de tissu ovarien des Cliniques universitaires Saint Luc la plus importante du

monde. Au sein de notre institution hospitalière, sept réimplantations de tissu ovarien décongelé ont été effectuées chez des patientes ayant eu un traitement par chimiothérapie (26). Chez toutes ces patientes, la technique de greffe de fragments ovariens a permis la restauration de l'activité ovarienne et dès lors de cycles menstruels réguliers.

LA GREFFE DE TISSU OVARIEN : NÉCESSITÉ DE POURSUIVRE LA RECHERCHE EXPÉRIMENTALE

Ces résultats prouvent que l'autotransplantation de cortex ovarien cryopréservé est cliniquement applicable. Cependant, avant de proposer cette technique dans la pratique clinique courante, il nous paraît essentiel de poursuivre la recherche expérimentale dans ce domaine afin de 1) maximiser les chances d'obtenir une grossesse spontanée, 2) développer de nouvelles options pour les indications comportant un risque de métastase ovarienne (telles que leucémies, cancers du sein et de l'ovaire).

Afin de proposer le mode de transplantation qui convient le mieux en fonction de chaque situation clinique (type de cancer, risque de transmission, âge), trois options sont investiguées:

- la congélation et l'autogreffe de cortex ovarien dont nous venons de démontrer l'applicabilité en clinique. ;
- la congélation et l'autogreffe de l'ovaire entier réduisant les problèmes associés à l'ischémie ;
- la cryopréservation et l'autogreffe de follicules isolés évitant le risque de retransmission de cellules malignes via le greffon.

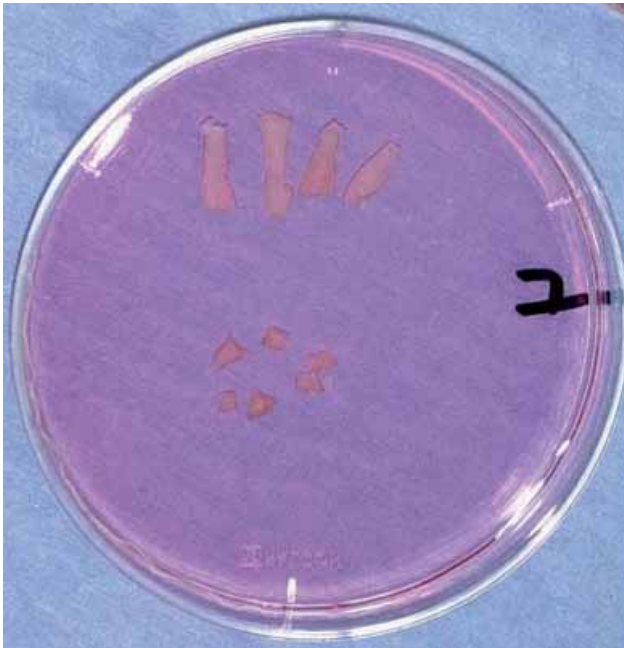
LA GREFFE DE FRAGMENTS

Plusieurs études réalisées sur modèle murin, dont celles de notre laboratoire (27, 28), montrent que la greffe de cortex ovarien humain entraîne une perte de 50 à 65 % des follicules primordiaux et de la totalité des follicules en croissance. Cette dégénérescence folliculaire serait liée à l'ischémie consécutive au délai (de 2 à 5 jours) de revascularisation du greffon, mais les mécanismes impliqués n'ont pas été caractérisés (29).

Une meilleure connaissance des mécanismes de revascularisation des greffons permettra de réduire les conséquences délétères de l'hypoxie et de faciliter le processus d'angiogenèse. Nos recherches portent sur la cinétique et la fonc-

tionnalité des néovaisseaux formés au sein des greffons dans un modèle *in vivo* de greffe de fragments de tissu ovarien humain. L'influence de différents sites de greffe sur la revascularisation et la survie du greffon est également étudiée dans ce modèle *in vivo*. Il n'existe, pour le moment, aucun consensus pour la greffe clinique en ce qui concerne le site de greffe idéal et la taille idéale des fragments à greffer (figure 1). Il est donc important d'investiguer ces deux sujets.

Figure 1 – Fragments de cortex ovarien humain avant cryopréservation. D'une part, 4 strips d'environ 6x2mm, et d'autre part 6 petits fragments.



CRYOPRÉSERVATION ET GREFFE D'OVAIRE ENTIER AVEC PÉDICULE VASCULAIRE

La greffe de l'ovaire entier avec réanastomose permet d'éviter le problème de revascularisation du greffon. La greffe d'un ovaire cryoprésumé avec son pédicule vasculaire a permis de rétablir la fertilité chez le rat et la brebis (30-32).

Le premier challenge, afin d'appliquer cette approche à l'ovaire humain a consisté à mettre au point une technique de congélation adaptée à l'ovaire humain plus volumineux. Notre équipe a publié un protocole de congélation lente de l'ovaire humain *in toto* impliquant une perfusion

de cryoprotecteur dans l'artère ovarienne (figure 2) qui permet d'obtenir un bon taux de survie du stroma, des vaisseaux et des follicules (75%) (33). Après cryopréservation, l'ultrastructure des différents compartiments cellulaires est préservée et aucun signe d'apoptose n'a été mis en évidence (pas de fragmentation d'ADN détectée par la technique de TUNEL et pas de caspase-3 active détectée par immunohistochimie) (34). L'intégrité du réseau vasculaire est maintenue, ce qui constitue un point particulièrement critique pour l'application de cette approche. L'optimisation des techniques chirurgicales de dissection, canulation et perfusion de l'artère ovarienne est en cours (35).

Figure 2 – Perfusion de la solution de cryoprotecteur via l'artère ovarienne après cathétérisation du pédicule vasculaire ovarien.

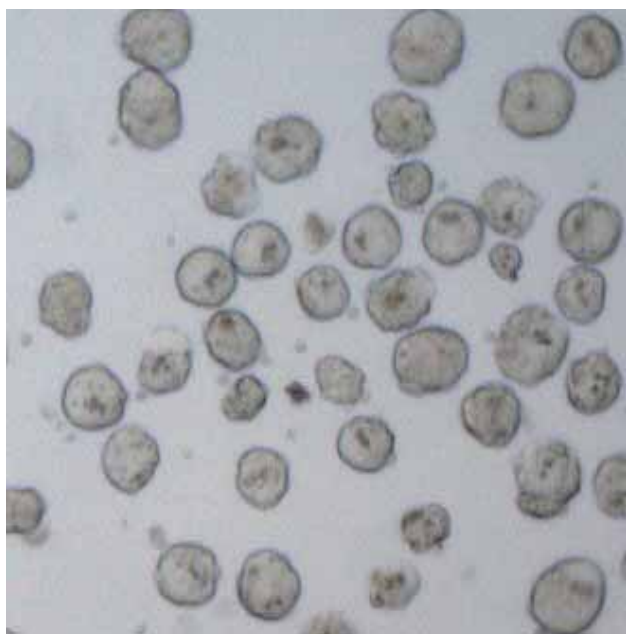


LA GREFFE DE FOLLICULES ISOLÉS, UNE NOUVELLE STRATÉGIE DE GREFFE OVARIENNE ?

La greffe de follicules isolés présente plusieurs avantages par rapport à la greffe tissulaire : 1) il n'y a pas de risque de transmission de cellules malignes dans le greffon (car le follicule primordial est une structure avasculaire protégée par sa membrane basale) 2) la population folliculaire peut être caractérisée avant réimplantation 3) il y a moins de problèmes liés à l'ischémie. Cette approche a été

appliquée avec succès dans un modèle expérimental de souris (36). Les protocoles d'isolement et de récupération folliculaires que nous avons mis au point préservent mieux l'intégrité des follicules humains (37) et permettent désormais d'envisager le développement de cette technique chez l'humain (figure 3). Les follicules pourront être greffés au niveau du cortex ovarien de la patiente dont les cellules stromales pourraient servir de support à la croissance folliculaire.

Figure 3 – Follicules ovariens humains obtenus après isolement enzymatique.



Nous avons pu démontrer la survie et la croissance de follicules ovariens humains après isolement et xéno-greffe à des souris nues (28). L'ultrastructure des follicules greffés à court terme est bien préservée et certains follicules ont débuté leur croissance folliculaire après une semaine de greffe. Après 4 mois de greffe, nous avons pu, grâce à une supplémentation en FSH, obtenir des follicules antraux. Ces résultats nous encouragent à poursuivre la recherche dans ce domaine. Le défi consiste à présent à standardiser les techniques d'isolement folliculaire et de greffe de follicules isolés et à les optimiser dans une optique d'application clinique.

CONCLUSION

En conclusion, grâce aux progrès conjugués dans le domaine de l'oncologie et de la cryopré-

servation du tissu ovarien, non seulement l'espérance de vie des jeunes patientes devant subir une chimiothérapie a augmenté, mais également leur qualité de vie de par l'immense espoir de restauration de la fertilité que leur apporte la cryopréservation du tissu ovarien.



RÉFÉRENCES

- Wallace WH, Anderson RA, Irvine DS: Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol.* 2005; **6**: 209-18.
- Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck A, Demylle D, Dolmans MM: Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update.* 2006; **12**:519-35.
- Wallace WH, Thomson AB, Saran F and Kelsey TW: Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;**62**:738-744.
- Wallace WH, Thomson AB and Kelsey TW: The radiosensitivity of the human oocyte. *Hum Reprod.* 2003;**18**:117-121.
- Donnez J, Godin PA, Qu J and Nisolle M: Gonadal cryopreservation in the young patient with gynaecological malignancy. *Current Op Obstet Gynecol.* 2000; **12**:1-9.
- Donnez J, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Demylle D and Van Langendonck A: The role of cryopreservation for women prior to treatment of malignancy. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2005;**17** :333-338.
- Torrents E, Boiso I, Barri PN and Veiga A: Applications of ovarian tissue transplantation in experimental biology and medicine. *Hum Reprod Update.* 2003; **9**:471-481.
- Van der Elst J: Oocyte freezing: here to stay? *Hum Reprod Update.* 2003; **9**(5):463-70.
- Stachecki JJ and Cohen J: An overview of oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online.* 2004; **9**:152-163.
- Donnez J and Bassil S: Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Hum Reprod Update.*1998; **4**:248-259.
- Sanders J, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner CD, Deeg HJ *et al.*: Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose Busulfan or total body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood.* 1996; **87**:3045-3052.
- Lobo RA: Potential options for preservation of fertility in women. *N Engl J Med.* 2005; **353**:64-73.
- Meirow D and Nugent D: The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update.* 2001; **7**:534-543.
- Teinturier C, Hartmann O, Valteau-Couanet D, Benhamou E and 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**:989-994.
- Salooja N, Szydlo RM, Socie G, Rio B, Chatterjee R, Ljungman P *et al.*, for the 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): 271-276.
- Mattle V, Behringer K, Engert A and Wildt L: Female fertility after cytotoxic therapy-protection of ovarian function during chemotherapy of malignant and non-malignant diseases. *Eur J Haematol.* 2005; **75**: 77-82.
- Eppig JJ and O'Brien MJ: Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod.* 1996; **54**:197-207.
- Gougeon A: Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Reviews.* 1996; **17**(2): 121-155.
- Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu KP, Takeuchi T *et al.*: Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet.* 2004; **363**: 837-840.

20. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J *et al.*: Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 2004; **364**:1405-10.
21. Meirou D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y *et al.*: Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med*. 2005; **353**: 318-321.
22. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y: Ongoing pregnancy after a second cryopreserved ovarian tissue transplantation procedure. *Hum Reprod*. 2007; **22**: i43: O109.
23. Andersen C, Loft A, Ernst E, Andersen AN, Rosendahl M: Assisted reproductive techniques after autotransplantation of frozen thawed ovarian tissue. *Hum Reprod*. 2007; **22**: i41: O104.
24. Demeestere I, Simon P, Buxant F, Robin V, Fernandez-Aguilar S, Centner J *et al.*: Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. *Hum Reprod*. 2006; **21**(8):2010-4.
25. Rosendahl M, Loft A, Byskov AG, Ziebe S, Schmidt KT, Andersen AN *et al.*: Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report. *Hum Reprod*. 2006; **21**:2006-9.
26. Donnez J, Squifflet J, Van Eyck AS, Demylle D, Jadoul P, Van Langendonck A, Dolmans MM: Restoration of ovarian function in orthotopically transplanted cryopreserved ovarian tissue: a pilot experience. Submitted
27. Nisolle M, Godin PA, Casanas-Roux F, Qu J, Motta P and Donnez J: Histological and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril*. 2000; **74**: 122-129.
28. Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Gadisseux E, Van Langendonck A, Camboni A, Coupe A, Donnez J: Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. *Reproduction*. 2007; **134**: 253-262.
29. Baird, DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM and Gosden RG: Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196°C. *Endocrinol*. 1999; **140**:462-471.
30. Wang X, Chen H, Yin H, Kim SS, Tan SL, Gosden RG: Fertility after intact ovary transplantation. *Nature*. 2002; **415**:385.
31. Yin H, Wang X, Kim SS, Chen H, Tan SL, Gosden RG: Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischemia and genotype. *Hum Reprod*. 2003; **18**:1165-72.
32. Bedaiwy A, Jeremias E, Gurunluoglu R, Hussein MR, Siemianow M, Biscotti C *et al.*: Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. *Fertil Steril*. 2003; **79**:594-602.
33. Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrère S, Donnez J: Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril*. 2004; **82**:1390-1397.
34. Martinez-Madrid B, Camboni A, Dolmans MM, Nottola SA, Van Langendonck A, Donnez J: Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. *Fertil Steril*. 2007; **87**:1153-1165.
35. Jadoul P, Donnez J, Dolmans MM, Squifflet J, Lengelé B, Martinez-Madrid B: Laparoscopic ovariectomy for whole human ovary cryopreservation: technical aspects. *Fertil Steril*. 2007; **87**:971-975.
36. Carroll J and Gosden RG: Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. *Hum Reprod*. 1993; **8**:1163-1167.
37. Dolmans MM, Michaux N, Camboni A, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A, Nottola SA, Donnez J: Evaluation of Liberase, a purified enzyme blend, for the isolation of human primordial and primary ovarian follicles. *Hum Reprod*. 2006; **21**:413-20.