

PRÉSERVATION DE LA FERTILITÉ MASCULINE AVANT TRAITEMENT GONADOTOXIQUE

CH. WYNS

Mots-clefs : fertilité, cryopréservation, chimiothérapie, spermatogonie.
Keywords : fertility, cryopreservation, chemotherapy, spermatogonia.

RÉSUMÉ

Correspondance :
Dr Christine WYNS
Cliniques universitaires Saint-Luc
Unité d'Andrologie
Avenue Hippocrate 10
1200 Bruxelles
Belgique

SUMMARY

Recent improvements in the treatment of malignant disease have brought into focus a number of issues relating to future quality of life, such as infertility following gonadotoxic therapy. Such therapy is being increasingly applied in case of benign disease and therefore involves an ever growing population.

After puberty, the freezing of sperm is considered routine clinical practice. However, for prepubertal patients, who do not yet produce spermatozoa, only immature tissue is available for storage. Cryopreservation of immature testicular tissue has recently become an acceptable procedure for long-term storage in cancer patients for fertility preservation.

Nevertheless, numerous crucial challenges remain, including efficient cryopreservation and thawing of testicular cell suspensions or tissue, selection and enrichment of stem cell spermatogonia without contamination by tumor cells, and effective transplantation techniques, either in the form of isolated cell injections into the rete testes or ortho- or heterotopic grafts.

L'amélioration de la survie à long terme des patients atteints de pathologies néoplasiques soulève des questions relatives à la qualité de vie future de ces patients, en particulier en terme de fertilité après traitement gonadotoxique.

Des thérapies gonadotoxiques sont également prescrites pour des pathologies bénignes, ce qui augmente encore la population concernée par la perte de la fertilité.

Chez l'adulte, la congélation de spermatozoïdes est d'application clinique courante. Avant la puberté, seules des cellules germinales immatures pourront être cryopréservées. La congélation de tissu testiculaire immature est depuis peu considérée comme une procédure acceptable pour préserver la fertilité des patients cancéreux devant subir un traitement gonadotoxique. Néanmoins, avant d'atteindre la restauration de la fertilité à partir de tissu congelé, de nombreuses avancées telles que l'optimisation de la technique de cryopréservation et de décongélation, la sélection et la multiplication des cellules spermatogoniales en l'absence de cellules tumorales contaminantes, l'amélioration des techniques de transplantation de cellules isolées dans le rete testis ou de greffe de fragments tissulaire devront être réalisées.

INTRODUCTION

L'amélioration de la survie à long terme des patients atteints de pathologies néoplasiques soulève des questions relatives à la qualité de vie future de ces patients, en particulier en terme de fertilité après traitement gonadotoxique. La survie à 5 ans des enfants traités pour néoplasie étant en constante évolution (tableau I), on estime qu'en 2010, un adulte âgé de 20 à 29 ans sur 250 sera le survivant d'une néoplasie infantile.

Des thérapies gonadotoxiques sont également prescrites pour des pathologies bénignes nécessitant une transplantation de moelle telle que la drépanocytose, la thalassémie majeure,...de sorte que cette question s'étend actuellement à une population encore plus large.

TABLEAU I
TRENDS IN SURVIVAL FOR CHILDREN UNDER AGE 15 (BORING, 1994)

Site	5 year relative survival rates (%) ^a			
	1960-1963	1970-1973	1977-1979	1983-1989
<i>Acute lymphocytic leukaemia</i>	4	34	67	72,4
<i>Acute myeloid leukaemia</i>	3	5	26	31,1
<i>Wilm's tumour</i>	33	70	77	88,4
<i>Brain and nervous system</i>	35	45	56	60,0
<i>Neuroblastoma</i>	25	40	52	56,7
<i>Bone</i>	20	30	52	58,3
<i>Hodgkin's disease</i>	52	90	83	88,3
<i>Non-Hodgkin's lymphomas</i>	18	26	50	67,6
<i>Testicular cancer</i>	-	-	-	90-95

^a Survival rates are according to the year in which the disease was diagnosed.
Meirow D., Schenker JG. Cancer and male infertility. *Human Reproduction*. 1995; 10: 2019.

Certaines stratégies de protection contre la gonadotoxicité utilisant des approches hormonales (1-3) ou des molécules interagissant avec les mécanismes d'apoptose (4,5) ont été développées, mais leur efficacité n'a pas été démontrée chez l'homme. L'amélioration des protocoles chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques en vue de réduire leur gonadotoxicité est une autre stratégie, mais il n'existe à ce jour aucun facteur prédictif absolu de la récupération d'une spermatogenèse après ce type de traitement (6-9).

IMPACT DES AGENTS CYTOTOXIQUES ET DE LA RADIOTHÉRAPIE SUR LA FERTILITÉ

La gonadotoxicité des agents chimiothérapeutiques a été mise en évidence dès 1948 suite à 27 cas

d'azoospermie observés chez 30 patients traités par « nitrogen mustard ». L'examen histologique du tissu testiculaire après traitement par un agent cytotoxique est variable. L'atteinte peut aller jusqu'à la disparition complète de l'épithélium germinatif et même des cellules de Leidig (10-12).

L'azoospermie est causée par la destruction des cellules souches spermatogoniales et la durée de l'azoospermie est proportionnelle au nombre de spermatogonies détruites (13,14).

L'altération de la fertilité et les chances de récupération sont fonction du type et de la dose des drogues utilisées (15), de l'éventuelle adjonction d'une radiothérapie (16), ainsi que de l'âge.

Le tableau II reprend les cytostatiques ayant les gonadotoxicités les plus significatives clinique-

TABLEAU II
CYTOSTATIQUES AYANT LES GONADOTOXICITÉS LES PLUS SIGNIFICATIVES CLINIQUEMENT

Group	Drug
<i>Alkylating agents</i>	<i>cyclophosphamide</i> <i>chlorambucil</i> <i>mustine</i> <i>melphalan</i> <i>busulphan</i> <i>carmustine (Clayton et al., 1988)</i> <i>lomustine (Clayton et al., 1988)</i> <i>procarbazine</i>
<i>Antimetabolites</i>	<i>cytarabine</i>
<i>Vinca alkaloids</i>	<i>vinblastine (Vilar, 1974)</i> <i>vincristine</i>
<i>Others</i>	<i>cisplatin (Wallace et al., 1989).</i>

Howell SJ., Shalet SM. Testicular function following chemotherapy. *European Society of Human Reproduction and Embryology*, 2001: 364.

quement. La plupart de ces agents sont administrés sous forme de protocoles combinant plusieurs drogues et la toxicité des drogues prises individuellement est donc difficile à établir (17).

L'utilisation de plusieurs drogues concomitamment augmente encore cette gonadotoxicité.

L'effet de la radiothérapie sur la spermatogenèse est bien documenté et dépend du champ traité, de la dose totale et de son fractionnement (18). Les cellules immatures sont les plus sensibles et des doses légères de 0,1 Gy entraînent des modifications qualitatives et quantitatives des spermatogonies.

Des doses supérieures à 0,8 Gy entraînent une azoospermie.

La récupération de la spermatogenèse à partir des spermatogonies de type A ayant survécu dépend de la dose d'irradiation. Le retour à des numérations spermatiques comparables à celles observées avant la radiothérapie s'observe après 9 à 18 mois pour des doses \leq à 1 Gy, après 30 mois pour des doses entre 2 et 3 Gy et, après 5 ans à partir de 4 Gy. Le fractionnement de la dose augmente la gonadotoxicité selon les études animales et certaines études chez l'homme sont également en faveur de cette constatation (19,20).

La fonction gonadique est également influencée par l'âge du patient. Ainsi, les traitements cytotoxiques semblent plus délétères après la puberté (21) mais l'état pré-pubère ne prémunit toutefois pas contre les effets gonadotoxiques (22-27). En effet, des études animales ont mis en évidence avant la puberté une activité des cellules germinales subissant ensuite une dégénérescence spontanée avant le stade haploïde, qui semble primordiale au fonctionnement gonadique chez l'adulte (28).

CRYOPRÉSERVATION DE GAMÈTES MATURES

La cryopréservation spermatique est bien documentée chez l'adulte et est actuellement régulièrement proposée pour préserver la fertilité avant tout traitement potentiellement gonadotoxique.

Les résultats en PMA utilisant le sperme congelé chez les patients devant bénéficier de ces traitements sont comparables à ceux obtenus lors de cycles de fécondation *in vitro* réalisés pour infertilité d'origine masculine (29,30).

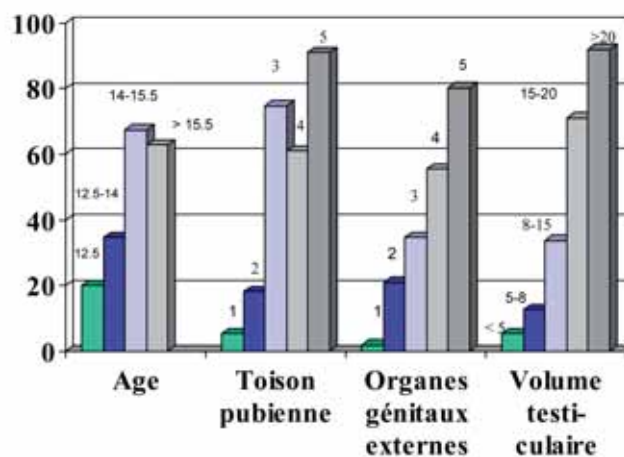
Cette technique n'est néanmoins envisageable que chez des patients péri ou post-pubères où la

spermatogenèse a été initiée. La cryopréservation des gamètes mâles avant la puberté présente en outre des facteurs limitants tels que notre connaissance limitée de la qualité du sperme chez le jeune adolescent, les problèmes liés à l'obtention de l'échantillon, qu'ils soient techniques (masturbation, vibrations péniennes, électrostimulation sous AG) (31-33) ou psychologiques (priorité liée à la gravité de la maladie, tabous, influence parentale) ainsi que les aspects éthiques liés au consentement.

Le développement pubertaire varie entre 13 et 18 ans et l'âge de la spermarche est difficile à connaître. Considérant la spermaturie comme indice de la spermarche, Nielsen *et al.* (34) estiment en moyenne que la spermatogenèse débute vers 13 ans et demi alors que d'autres auteurs la situeraient plutôt vers 14 ans. Selon Hirsch *et al.*, aucun cas de spermaturie n'est observé avant l'âge de 11 ans et dans 40 % des cas, la spermaturie est absente avant l'âge de 15 ans (35).

Certaines caractéristiques physiques telles que le volume testiculaire, les modifications des caractères sexuels secondaires ou encore une augmentation de la vitesse de croissance, témoignent du début de la spermatogenèse (34,36) (fig. 1).

Figure 1 – Overall cumulative probability of spermaturia according to age, Tanner stages for pubic hair (1-5) and genitals (1-5), and testicular volume (ml) (n=129), Selon Schaefer *et al.* Archives of Disease in Childhood. 1990; 65: 1205-1207.



Les modifications du profil hormonal de l'adolescent observables par l'élimination de LH, de FSH et de testostérone par voie urinaire (37) apportent un complément d'information à l'examen urinaire.

En l'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat, leur récupération par biopsie testiculaire a été décrite entre l'âge de 10 et 13 ans et peut donc être une alternative (38).

Kliesch *et al.* ont observé une qualité spermatique similaire en terme de numération, mobilité et morphologie chez des garçons pubères de 14 à 17 ans, des jeunes adultes de 18 à 20 ans et de plus de 20 ans souffrant des mêmes néoplasies (39). D'autres ont examiné la qualité spermatique chez des adolescents post-pubères avant l'âge de 19 ans souffrant de différents types de cancers (40). La cryopréservation a pu être réalisée chez 86,1 % des patients indépendamment de l'âge et du diagnostic, et les échantillons obtenus étaient adéquats pour une utilisation ultérieure en PMA.

CRYOPRÉSERVATION DES GAMÈTES IMMATURES

La cryopréservation du tissu testiculaire chez l'adulte azospermique telle qu'elle est appliquée en clinique actuellement, en particulier à titre diagnostique et thérapeutique, est bien connue. Dans ce cas, le but est de congeler des spermatozoïdes matures et des spermatozoïdes en vue de leur utilisation future en FIV avec ICSI.

Chez l'enfant, les cellules germinales à ces stades avancés ne sont pas retrouvées. En effet, jusqu'à l'âge de 4 ans, les seuls types cellulaires observables sont les spermatogonies Ad (dark) ou Ap (pale). A partir de 4 ans apparaissent des spermatogonies de type B. Cette apparition lente d'abord, s'accélère vers l'âge de 5 ans pour devenir importante au début de la puberté. A partir de la puberté apparaissent les spermatocytes primaires et secondaires (haploïdes). Ces derniers témoignent de la deuxième division méiotique.

La présence de spermatocytes primaires vers l'âge de 4 ans et vers 8-9 ans est normale. Exceptionnellement, ces cellules peuvent évoluer jusqu'au stade de spermatides mais dégénèrent avant d'atteindre le stade de spermatozoïde (41).

Chez le garçon pré-pubère, le but est de cryopréserver les spermatogonies souches dont la taille est largement supérieure à celle des spermatozoïdes.

La méthode de choix pour cryopréserver ces cellules, soit sous la forme de tissu testiculaire (42-45), soit sous la forme de suspensions cellulaires testiculaires (46) est en cours d'évaluation. La cryopréservation de tissu testiculaire est plus

délicate que la cryopréservation de cellules en suspension, étant donné qu'elle nécessite une pénétration plus grande du cryoprotectant (47). En outre, différents types cellulaires ayant chacun leurs propres caractéristiques constituent le tissu ; cette hétérogénéité cellulaire compliquant dès lors l'élaboration de protocoles de congélation optimaux.

L'utilisation future du tissu congelé en vue de préserver la fertilité soit par transplantation autologue de cellules souches en suspension, soit par maturation *in vitro*, soit par autogreffe d'un fragment de tissu testiculaire, sont des voies prometteuses bien qu'incertaines.

LA TRANSPLANTATION DE CELLULES SPERMATOGONIALES

La transplantation de cellules spermatogoniales a été développée récemment et consiste à transférer des cellules germinales souches d'un donneur mâle par injection directe dans les tubules séminifères, dans le rete testis ou dans les canaux efférents du mâle receveur. Les cellules transplantées migrent ensuite vers la membrane basale du tube séminifère, se multiplient et établissent des colonies de cellules germinales à l'origine des spermatozoïdes.

La transplantation de cellules spermatogoniales a initialement été rapportée par Brinster *et al.* en 1994 (48). Une progéniture porteuse de l'haplotype du donneur a été générée chez la souris (49).

Une spermatogenèse complète a également été obtenue après transplantation de cellules germinales de rat et de hamster à la souris (50,51).

Des études ultérieures ont montré que les cellules spermatogoniales souches d'autres espèces telles que le chien, le porc, le lapin, la chèvre, la vache, le singe et l'homme colonisent les tubules séminifères de souris immunodéprimées et génèrent des colonies de cellules souches en l'absence de différenciation des cellules germinales (52-55).

Au sein d'une même espèce, une transplantation de cellules germinales de chèvres transgéniques à des chèvres immatures immunocompétentes a néanmoins permis la transmission du gène modifié à la descendance (56).

Par ailleurs, la cryopréservation des cellules germinales avant transplantation n'interfère ni avec la recolonisation et l'initiation d'une sper-

matogenèse (57), ni avec l'obtention d'une progéniture (58).

Une technique de transplantation de cellules germinales dans le rete testis de testicules humains a été développée *in vitro* (59).

En 1999, une étude clinique a été initiée à Manchester (GB) pour évaluer la transplantation de cellules germinales chez des patients atteints de tumeurs malignes solides (60). Une cryopréservation de suspensions cellulaires provenant de biopsies testiculaires a été réalisée avant le traitement gonadotoxique et 7 patients auraient bénéficié de la transplantation des cellules germinales. Malheureusement, aucune information n'est actuellement disponible concernant la fertilité de ces patients avant et après la transplantation (61).

Cette évaluation resterait néanmoins compliquée suite à la difficulté à différencier la spermatogenèse initiée à partir des cellules transplantées de celle issue des cellules germinales résiduelles après traitement gonadotoxique.

L'avantage de cette approche est qu'elle permettrait de restaurer la fertilité naturelle du patient à partir de ses cellules germinales propres.

Après recolonisation, chaque colonie est issue de la prolifération clonogénique et la différenciation d'une cellule spermatogonale souche unique.

L'étendue de la spermatogenèse dépend du nombre de cellules souches transplantées et de la quantité et qualité des niches cellulaires dans le testicule receveur.

Chez les rongeurs, le rendement de la colonisation ne dépasse pas 5 à 12% (62,63).

On estime que chez le primate ayant des cycles spermatogéniques plus longs, ce rendement serait même inférieur (64). Dès lors, si l'on considère en outre le faible nombre de spermatogonies souches dans un fragment prélevé pour cryopréservation, cette technique ne pourra vraisemblablement pas être applicable en clinique humaine avant de développer des méthodes permettant d'enrichir la suspension injectée en cellules souches spermatogoniales ou d'augmenter leur capacité de recolonisation tubulaire.

A ce jour, la culture de spermatogonies souches en vue d'augmenter leur nombre *in vitro* avant transplantation n'a été décrite que chez la souris et le bovin (65-68).

L'identification des agents régulateurs de la multiplication spermatogonale et des mécanismes impliqués dans leur renouvellement est en cours d'étude (69-76).

L'application de la technique de transplantation de cellules spermatogoniales de patients atteints de pathologies néoplasiques pose un second problème non négligeable. En effet, il existe un risque théorique de récurrence de la pathologie traitée par réinoculation de cellules néoplasiques à partir de suspensions cellulaires insuffisamment purifiées.

Une étude chez le rat a montré qu'à peine 20 cellules leucémiques injectées dans un testicule suffisent à entraîner une récurrence du cancer (77). La greffe xénogénique du tissu testiculaire humain à la souris décrite par Honaramooz (78) pourrait dès lors être utilisée comme test diagnostique de contamination comme cela a été fait pour l'ovaire (79).

Des techniques de tri cellulaire par MACS et FACS basées sur l'expression de marqueurs spécifiques des cellules spermatogoniales et tumorales semblaient prometteuses chez l'animal afin de décontaminer les préparations cellulaires (80) mais récemment, il a été démontré que la détection des cellules tumorales par tri cellulaire était insuffisante pour une décontamination complète (81).

LA GREFFE DE TISSU TESTICULAIRE

La xéno-transplantation de fragments de tissu testiculaire a été réalisée dans diverses espèces animales.

Une spermatogenèse complète a été observée après greffe de tissu testiculaire de souris, hamster, rat, porc, chat, bovin, cheval incluant les primates (82-90) à l'exception de l'homme (91).

La cryopréservation du tissu avant greffe n'empêche pas la récupération d'une spermatogenèse complète dans des isogreffes de souris (82) et dans des xénogreffes de lapin à la souris (92). Toutefois, chez le primate, la différenciation complète n'a pas été observée après cryopréservation (93).

Une progéniture a pu être obtenue à partir de spermatozoïdes issus d'une allogreffe de tissu testiculaire chez la souris (92,94).

Des xénogreffes hétérotopiques de tissu testiculaire humain adulte ont montré une survie très limitée des greffons (90,94).

A l'inverse, les greffes de tissu testiculaire immature humain ont donné de meilleurs résultats.

En effet, un modèle de xénogreffe chez la souris nude, nous a permis de démontrer la capacité des spermatogonies et des cellules de Sertoli à survivre et proliférer au sein de tubules séminifères ayant une intégrité bien préservée après cryopréservation (45).

La capacité de différenciation des cellules germinales au sein des greffons de tissu testiculaire immature humain reste à démontrer.

L'avantage de cette technique comparative-ment à la transplantation de cellules isolées est la préservation concomitante de niches intactes pour les spermatogonies souches, favorisant les interactions cellulaires complexes entre les cellules germinales et les cellules somatiques indispensables au bon déroulement de la spermatogenèse.

LA MATURATION IN VITRO

Les trois phases de la spermatogenèse sont la multiplication des spermatogonies, la méiose et la spermiogenèse. Pendant la spermatogenèse, les spermatogonies diploïdes se multiplient par mitoses pour fournir une population de spermatocytes qui vont donner naissance à des spermatoïdes haploïdes grâce à la méiose. Les spermatoïdes vont débiter ensuite, durant la spermiogenèse, une différenciation morphologique aboutissant aux spermatozoïdes (96).

La maturation in vitro des cellules germinales mâles implique donc la reconstitution intégrale de ces étapes au laboratoire. De nombreux facteurs de régulation interviennent dans ces processus; pour certains d'entre eux, la cellule qui les produit est connue, pour d'autres, les cellules dotées de récepteurs à ces facteurs sont identifiées. Cependant, pour la plupart de ces facteurs, leur action spécifique sur la différenciation des cellules germinales, au niveau de telle ou telle étape, est inconnue.

Durant ces dix dernières années, de nombreuses tentatives ont été rapportées pour créer des systèmes de culture permettant la prolifération des spermatogonies souches et la différenciation des spermatocytes méiotiques (65-68,97,98).

Récemment, une partie, puis la totalité de l'étape méiotique a été reproduite in vitro dans différentes espèces (99-101).

Des modifications dans la cinétique de différenciation ont été observées ainsi que des anomalies des spermatoïdes ronds formés in vitro. Néanmoins, les spermatoïdes ronds développés in vitro à partir de spermatocytes ont permis l'obtention de souris normales dans un nombre de cas restreint, lorsqu'elles étaient injectées dans des ovocytes matures (102).

La maturation in vitro des spermatoïdes ronds a également été rapportée chez l'animal (103,104).

Des études ont également été réalisées in vitro sur la spermatogenèse humaine (105-108).

Concernant la spermiogenèse, peu de données existent et presque tout reste à faire pour reproduire cette étape in vitro (109).

Cette technique constitue néanmoins une approche intéressante pour les patients atteints de pathologies pouvant métastaser par voie hématologique. En effet, l'obtention de spermatozoïdes in vitro combinée à une fécondation in vitro avec microinjection du spermatozoïde dans l'ovocyte éviterait tout risque de réinoculation de cellules néoplasiques au patient.

Cette approche serait également utile lorsque les cellules de Sertoli ne sont pas capables d'assurer leur fonction de support de la spermatogenèse. En effet, certains arguments en faveur de l'existence de dommages causés au niveau des cellules de Sertoli par les agents chimiothérapeutiques ont été rapportés (110).

Bien que la restauration de la fertilité a été obtenue après maturation in vitro des cellules germinales humaines (111), celle-ci ne concernait que les étapes finales de maturation et non la maturation à partir des cellules souches. Dès lors, la maturation in vitro des cellules germinales diploïdes en spermatozoïdes haploïdes ne sera techniquement pas réalisable dans un proche avenir.

CONCLUSION

La préservation de la fertilité, par congélation de spermatozoïdes chez l'adulte ou de tissu testiculaire immature avant la puberté, est importante pour assurer une qualité de vie future aux patients rendus infertiles par les traitements gonadotoxiques. Toutefois, dans le cas où les gamètes matures ne sont pas encore présents, les méthodes de restauration de la fertilité ne pourront être appli-

quées en clinique humaine que lorsque de nombreuses questions techniques, éthiques, ou liées à la sécurité des procédures, seront résolues.



RÉFÉRENCES

- Johnson DH, Linde R, Hainsworth JD, Vale W, Rivier J, Stein R *et al.*: Effect of a luteinizing hormone releasing hormone agonist given during combination chemotherapy on post therapy fertility in male patients with lymphoma: preliminary observations. *Blood*. 1985; **65**: 832-836.
- Waxman JH, Ahmed R, Smith D, Wrigley PF, Gregory W, Shalet S *et al.*: Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1987; **19**: 159-162.
- Shetty G, Meistrich ML : Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2005; **34**: 36-39.
- Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A *et al.*: Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nature Medicine*. 2000; **10**: 1109-1114.
- Morita Y, Perez GI, Maravei DV, Tilly KI, Tilly JL : Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis *in vitro*. *Molecular Endocrinology*. 1999; **13**: 841-850.
- Jaffe N, Sullivan MP, Ried H, Boren H, Marshall R, Meistrich M *et al.*: Male reproductive function in long-term survivors of childhood cancer. *Medical and Pediatric Oncology*. 1988; **16**: 241-247.
- Naysmith TE, Blake DA, Harvey VJ, Johnson NP : Do men undergoing sterilizing cancer treatments have a fertile future? *Human Reproduction*. 1998; **13**: 3250-3255.
- Mackie EJ, Radford M, Shalet SM : Gonadal function following chemotherapy for childhood Hodgkin's disease. *Med Pediatr Oncol.* 1996; **27**: 74-78.
- Whitehead E, Shalet SM, Jones PH, Beardwell CG, Deakin DP : Gonadal function after combination chemotherapy for Hodgkin's disease in childhood. *Arch Dis Child.* 1982; **57**: 287-291.
- Howell SJ, Radford JA, Ryder WD, Shalet SM : Testicular function after cytotoxic chemotherapy: evidence of Leydig cell insufficiency. *Journal of Clinical Oncology*. 1999; **17**: 1493-1498.
- Gerl A, Muhlbayer D, Hansmann G, Mraz W, Hiddemann W : The impact of chemotherapy on Leydig cell function in long term survivors of germ cell tumors. *Cancer*. 2001; **91**: 1297-1303.
- Lendon M, Hann IM, Palmer MK, Shalet SM, Jones PH : Testicular histology after combination chemotherapy in childhood for acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1978; **2**: 439-41.
- Meistrich ML : Relationship between spermatogonial stem cell survival and testis function after cytotoxic therapy. *Br J Cancer*. 1986; **53** (Suppl. VII): 89-101.
- Meistrich ML : Quantitative correlation between testicular stem cell survival, sperm production and fertility in the mouse after treatment with different cytotoxic agents. *J Androl*. 1982; **3**: 58-68.
- Howell SJ, Shalet SM : Testicular function following chemotherapy. *Human Reprod Update*. 2001; **7**: 363-369.
- Pryzant RM, Meistrich ML, Wilson G, Brown B, McLaughlin P : Long-term reduction in sperm count after chemotherapy with and without radiation therapy for non-Hodgkins lymphomas. *J. Clin. Oncol.* 1993; **11**: 239-247.
- Meistrich ML, Wilson G, Brown BW, da Cunha MF, Lipshultz LI : Impact of cyclophosphamide on long-term reduction in sperm count in men treated with combination chemotherapy for Ewing and soft tissue sarcomas. *Cancer*. 1992; **70**: 2703-2712.
- Shalet SM : Effects of irradiation treatment on gonadal function in men treated for germ cell cancer. *Eur Urol*. 1993; **23**: 148-151.
- Centola GM, Keller JW, Henzler M, Rubin P : Effects of low-dose testicular irradiation on sperm count and fertility in patients with testicular seminoma. *J Androl*. 1994; **15**: 608-613.
- Hahn EW, Feingold SM, Rubin P : Effects of low-dose testicular of spermatogenesis in cancer patients following incidental gonadal irradiation during treatment: a progress report. *Radiology*. 1976; **119**: 223.
- Heikens J, Behrendt H, Adriaanse R, Berghout A : Irreversible gonadal damage in male survivors of pediatric Hodgkin's disease. *American Cancer Society* 1996; **78**: 2020-2024.
- Shafford EA, Kingston JE, Malpas JS, Plowman PN, Pritchard J, Savage MO, Eden OB : Testicular function following the treatment of Hodgkin's disease in childhood. *Br J Cancer*. 1993; **68**: 1199-1204.
- Aubier F, Flamant F, Brauner R, Caillaud JM, Chaussain JM, Lemerle J : Male gonadal function after chemotherapy for solid tumors in childhood. *J Clin. Oncol.* 1989; **7**: 304-309.
- Longhi A, Macchiagodena M, Vitali G, Bacci G : Fertility in male patients treated with neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 2003; **25**: 292-296.
- Kenney LB, Laufer MR, Grant FD, Grier H, Diller L : High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood. *Cancer*. 2001; **91**(3): 613-621.
- Rivkees SA, Crawford JD : The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage. *JAMA*. 1988; **259**: 2123-2125.
- Jaffe N, Sullivan MP, Ried H, Boren H, Marshall R, Meistrich M *et al.*: Male reproductive function in long-term survivors of childhood cancer. *Medical and Pediatric Oncology*. 1988; **16**: 241-247.
- Chemes HE : Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int J Androl*. 2001; **24**: 2-7.
- Agarwal A, Ranganathan P, Kattal N, Pasqualotto F, Hallak J, Khayal S, Mascha E : Fertility after cancer: a prospective review of assisted reproductive outcome with banked semen specimens. *Fertil Steril*. 2004; **81**: 342-348.
- Ginsburg ES, Yanushpolsky EH, Jackson KV: In vitro fertilization for cancer patients and survivors. *Fertility Steril*. 2001; **75**: 705-710.
- Hovav Y, Dan-Goor M, Yaffe H, Almagor M: Electroejaculation before chemotherapy in adolescents and young men with cancer. *Fertil Steril*. 2001; **75**(4): 811-813.
- Müller J, Sonksen J, Sommer P, Schmiegelow M, Meidahl Petersen P, Heilman C *et al.*: Cryopreservation of semen from pubertal boys with cancer. *Med Ped Oncol*. 2000; **34**: 191-194.
- Schmiegelow ML, Sommer P, Carlsen E, Sonksen JOR, Schmiegelow K, Müller JR : Penile vibratory stimulation and electroejaculation before anticancer therapy in two pubertal boys. *J Ped Hematol Oncol*. 1998; **20**(5): 429-430.
- Nielsen CT, Skakkebaek NE, Darling JA, Hunter WM, Richardson DW, Jørgensen M, et al : Longitudinal study of testosterone and luteinizing hormone (LH) in relation to spermarche, pubic hair, height and sitting height in normal boys. *Acta Endocrinol. Suppl.* 1986; **279**: 98-106.
- Hirsch *et al.* Emission of spermatozoa, age of onset. *Int. J. Androl*. 1979; **2**: 289-298.
- Schaefer F, Marr J, Seidel C, Tilgen W, Scharer K : Assessment of gonadal maturation by evaluation of spermaturia. *Archives of Disease in Childhood*. 1990; **65**: 1205-1207
- Kulin HE, Frontera MA, Demers LM, Bartholomew MJ, Lloyd TA : The onset of sperm production in pubertal boys. Relationship to gonadotropin excretion. *Am. J. Dis. Child*. 1989; **143**: 190-193
- Hovatta O : Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients. *European Society of Human Reproduction and Embryology*. 2001; **7**: 378-383.
- Kliesch S, Behre HM, Jurgens H, Nieschlag E: Cryopreservation of semen from adolescent patients with malignancies. *Med. Pediatr. Oncol*. 1996; **26**(1): 20-7.

40. Bahadur G, Ling KL, Hart R, Ralph D, Wafa R, Ashraf A et al.: Semen quality and cryopreservation in adolescent cancer patients. *Hum. Reprod.* 2002; **17**: 3157-3161.
41. Nistal M., Paniagua R : Occurrence of primary spermatocytes in the infant and child testis. *Andrologia.* 1984; **16**(6): 532-536.
42. Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O : Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Hum Reprod.* 2005; **20**: 1676-1687.
43. Keros V, Hultenby K, Borgström B, Fridström M, Jahnukainen K, Hovatta O : Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Hum Reprod.* 2007; **22**(5): 1384-1395.
44. Kvist K, Thorup J, Byskov AG, Hoyer PE, Mollgard K, Yding Andersen C : Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Hum Reprod.* 2006; **21**(2): 484-491.
45. Wyns C, Curaba M, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A, François-Xavier W, Donnez J : Spermatogonial survival after cryopreservation and short-term orthotopic immature human cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice *Hum Reprod.* 2007; **22**(6): 1603-1611.
46. Brook P, Radford J, Shalet S, Joyce A, Gosden R : Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil Steril.* 2001; **75**: 269-274.
47. Leibo SP, Mazur P : The role of cooling rates in low-temperature preservation. *Cryobiology.* 1971; **8**: 447-452.
48. Brinster RL, Zimmerman JW : Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(24): 11298-11302.
49. Brinster R.L., Avarbock MR : Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; **91**: 11303-11307.
50. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL : Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biology of Reproduction.* 1999; **60**: 515-521.
51. Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL : Rat spermatogenesis in mouse testes following spermatogonial stem cell transplantation. *Nature.* 1996; **381**: 418-21.
52. Dobrinski I, Avarbock M., Brinster RL : Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biology Reproduction.* 1999a; **61**: 1331-1339.
53. Nagano M, McCarrey JR, Brinster RL: Primate spermatogonial stem cells colonise mouse testes. *Biol. Reprod.* 2001; **64**: 1409-1416.
54. Honaramooz A, Behboodi E, Meege SO, Overton SA, Galantino-Homer H, Echelard Y, Dobrinski I : Fertility and Germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. *Biol Reprod.* 2003; **69**: 1260-1264.
55. Oatley J, M de Avila DM, McLean DJ, Griswold MD, Reeves JJ : Transplantation of bovine germinal cells into mouse testes. *J. Anim. Sci.* 2002; **80**: 1925-1931.
56. Nagano M, Patrizio P, Brinster RL : Long-term survival of human spermatogonia stem cells in mouse testes. *Fertil Steril.* 2002; **78**: 1225-1233
57. Avarbock, MR, Brinster, CJ, Brinster, RL : Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nature Med.* 1996; **2**: 693-696
58. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T : Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum Reprod.* 2003; **18**: 2660-2667.
59. Schlatt S, Rosiepen G, Weinbauer GF, Rolf C, Brook PF, Nieschlag E : Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Human Reprod.* 1999; **14**: 144-150.
60. Radford JA, Shalet SM : Lieberman BA. Fertility after treatment for cancer. *Br Med. J.* 1999; **319**: 935-936
61. Radford J : Restoration of fertility after treatment for cancer. *Hormone Res.* 2003; **59** suppl. 1: 21-23.
62. Dobrinski I, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL : Computer assisted image analysis to assess colonization of recipient seminiferous tubules by spermatogonial stem cells from transgenic donor mice. *Mol Reprod.* 1999; **Dev** **53**: 142-148.
63. Nagano MC : Homing efficiency and proliferation kinetics of male germ line stem cells following transplantation in mice. *Biol Reprod.* 2003; **69**: 701-707.
64. Jahnukainen K, Ehmcke J, Söder O, Schlatt S : Clinical potential and putative risks of fertility preservation in children utilizing gonadal tissue or germline stem cells. *Pediatr Res.* 2006; **59**: 40R-47R.
65. Brinster RL, Nagano M : Spermatogonial stem cell transplantation cryopreservation and culture. *Semin Cell Develop Biol.* 1998; **9**: 401-409.
66. Izadyar F, Den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, De Rooij DG : Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol Reprod.* 2003; **68**(1): 272-281.
67. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL :Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; **101**(47): 16489-16494.
68. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Yoshida S, Toyokuni S et al.: Leukemia inhibitory factor enhances formation of germ cell colonies in neonatal mouse testis culture. *Biol Reprod.* 2007; **76**(1): 52-62.
69. De Rooij DG : Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction.* 2000; **121**: 347-354.
70. Tulina NM : Molecular control of spermatogonial stem cell self-renewal by glycoprotein unpaired, a cytokine homolog, In *Drosophila Melanogaster.* *Doklady Biol Sc.* 2003; **388**: 79-82.
71. Oatley JM, Avarbock MR, Teleranta AI, Fearon DT, Brinster RL : Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sc U S A* 2006; **103**: 9254-9259.
72. Wong MD, Jin Z, Xie T : Molecular mechanisms of germline stem cell regulation. *Annu Rev Genet.* 2005; **39**: 173-195.
73. Falender AE, Freiman RN, Geles KG, Lo KC, Hwang K, Lamb DJ, et al: Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev.* 2005; **19**: 794-803.
74. Suzuki A, Tsuda M, Saga Y : Functional redundancy among Nanos proteins and a distinct role of Nanos2 during male germ cell development. *Development* 2007; **134**: 77-83.
75. Kubota H, Avarbock MR, Brinster TL : Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; **101**(47): 16489-16494.
76. Aponte PM, Soda T, van de Kant HJ, de Rooij DG : Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Theriogenology* 2006; **65**(9): 1828-1847.
77. Jahnukainen K: Intratesticular transplantation of testicular cells from leukemic rats causes transmission of leukaemia. *Cancer Research.* 2001; **61**: 706-710.
78. Honaramooz A, Snedaker A, Boiani M, Scholer HR, Dobrinski I, Schlatt S : Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature.* 2002; **418**: 788-791.
79. 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 autotransplantation. *Hum Reprod.* 2001; **16**: 2056-2060.
80. Fujita K, Ohta H, Tsujimura A, Takao T, Miyagawa Y, Takada S et al.: Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. *J Clin Invest.* 2005; **115**(7):1855-1861
81. Geens M, Van de Velde H, De Block G, Goossens E, Van Steirteghem A, Tournaye H : The efficiency of magnetic-activated cell sorting and fluorescence-activated cell sorting in the decontamination of testicular cell suspensions in cancer patients. *Hum Reprod.* 2007; **22**(3): 733-742.
82. Schlatt S, Samuel Kim S, Gosden R: Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. *Reprod.* 2002; **124**: 339-346.
83. Honaramooz A, Li M-W, Penedo CT, Meyers S, Dobrinski I : Accelerated maturation of primate testis by xenografting into mice. *Biol Reprod.* 2004; **70**: 1500-1503.

84. Johnson L, Suggs LC, Norton YM, Zeh WC : Effect of developmental age of time after transplantation on Sertoli cell number and testicular size in inbred fischer rats. *Biol Reprod.* 1996; **54**: 948-959.
85. Rathi R, Honaramooz A, Zeng W, Schlatt S, Dobrinski I : Germ cell fate and seminiferous tubule development in bovine testis xenografts. *Reprod.* 2005; **130**: 923-929.
86. Rathi R, Honaramooz A, Zeng W, Turner R, Dobrinski I : Germ cell development in equine testis tissue xenografted into mice. *Reproduction.* 2006; **131**: 1091-1098.
87. Snedaker AK, Honaramooz A, Dobrinski I : A game of cat and mouse: xenografting of testis tissue from domestic kittens results in complete cat spermatogenesis in a mouse host. *J Androl.* 2004; **25**: 926-930.
88. Schmidt JA, de Avila JM, McLean DJ : Grafting periode and donor age affect the potential for spermatogenesis in bovine ectopic testis xenografts. *Biol Reprod.* 2006; **75**: 160-166.
89. Huang S, Sartini BL, Parks JE :Spermatogenesis in testis xenografts grafted from pre-pubertal Holstein bulls in re-established by stem cell or early spermatogonia. *Anim Reprod Sci.*2006; [Epub ahead of print].
90. Schlatt S, Honaramooz A, Ehmcke J, Goebell PJ, Rübben H, Dhir R *et al.*: Limited survival of adult human testicular tissue as ectopic xenograft. *Hum Reprod.* 2006; **21**: 384-389.
91. Honaramooz A, Li MW, Penedo MC, Meyers S, Dobrinski I : Accelerated maturation of primate testis by xenografting into mice. *Biol Reprod.* 2004; **70**(5): 1500-1503.
92. Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Nakata K *et al.*: Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. *Hum Reprod.* 2002; **17**: 3039-3045.
93. Jahnukainen K, Ehmcke J, Hergenrother SD, Schlatt S : Effect of cold storage and cryopreservation of immature non-human primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts. *Hum Reprod.* 2006; Dec 13 (Epub ahead of print)
94. Schlatt S, Honaramooz A, Boiani M, Schöler HR, Dobrinski I : Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes. *Biol Reprod.* 2003; **68**: 2331-2335.
95. Geens M, De Block G, Goossens E, Krederickx V, Van Steirteghem A, Tournaye H : Spermatogonial survival after grafting human testicular tissue to immunodeficient mice. *Hum Reprod.*2006; **21**(2): 390-396.
96. Clermont Y : Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. *Fertil Steril.* 1966; **17**: 705-721.
97. Le Magurese-Battistoni B, Gerard N, Jegou B : pachytene spermatocytes can achieve meiotic process in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; **179**: 1115-1121.
98. Weiss W, Vigier M, Hue E : Pre- and post-meiotic expression of male germ cell-specific genes throughout 2 week xoculture of rat germinal and Sertoli cells. *Biol Reprod.* 1997; **57**: 68-76.
99. Staub C, Hue D, Nicolle JC, Perrard-Sapori MH, Segretain D, Durand P: The whole meiotic process can occur in vitro in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp Cell Res.* 2000; **260**: 85-95.
100. Parvinen M, Wright WW, Phillips DM, Mother JP, Musto NA, Bardin CW : Spermatogenesis in vitro: completion of meiosis and early spermiogenesis. *Endocrinology.* 1983; **112**: 150-152.
101. Perrard MH, Hue D, Staub C, LeVern Y, Kerboeuf D, Durand P : Development of the meiotic step in testes of pubertal rats: comparison between the in vivo situation and under in vitro conditions. *Mol Reprod Develop.* 2003; **65**: 86-95.
102. Marh J, Tres LL, Yamazaki Y, Yanagimachi R, Kierszenbaum AL : Mouse round spermatids developed in vitro from pre-existing spermatocytes can produce normal offspring by nuclear injection into in vivo-developed mature oocytes. *Biol Reprod.* 2003; **69**: 169-176.
103. Cremades N, barnabell R, Barton A, Sousa M : In-vitro maturation of round spermatids using co-culture on Vero cells. *Hum Reprod.* 1999; **14**:1287-1293.
104. Movahedin M, Ajeen A, Ghorbanzadeh N, Tiraihi T, Valojerdi MR, Kazemnejad A. In vitro maturation of fresh and frozen-thawed mouse round spermatids. *Andrologia.* 2004; **36**(5): 269-276.
105. Tanaka A, Nagayoshi M, Awara S, Mawatrai Y, Tanaka I, Kusunoki H : Completion of meiosis in human primary spermatocytes through in vitro coculture with Vero cells. *Fertil Steril.* 2003; **79**: 795-801.
106. Lee JH, Gye MC, Choi KW, Hong JY, Lee YB, Park DW *et al.*: In vitro differentiation of germ cells from nonobstructive azoospermic patients using three-dimensional culture in a collagen gel matrix. *Fertil Steril.* 2007; **87**(4): 824-833.
107. Tesarik J, Mendoza C, Greco E: In-vitro maturation of immature human male germ cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; **166**: 45-50.
108. Lee DR, Kim KS, Yang YH, Oh HS, Lee SH, Chung TG *et al.*: Isolation of male germ stem cell-like cells from testicular tissue of non-obstructive azoospermic patients and differentiation into haploid male germ cells in vitro. *Hum Reprod.* 2006; **21**(2): 471-476.
109. Vigier M, Weiss M, Perrard MH, Godet M, Durand P: The effects of FSH and testosterone on the completion of meiosis and the very early steps of spermiogenesis of the rat: an in vitro study. *J Mol Endocrinol* 2004; **33**: 727-742.
110. Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Marks A, Hauser R, Botchan A, Yavetz H: Sertoli cell inactivation by cytotoxic damage to the human testis after cancer chemotherapy. *Fertil Steril.* 2004; **81**(5): 1391-1394.
111. Tesarik J, Bahceci M, Ozcan C, Greco E, Mendoza C. Restoration of fertility by in-vitro spermatogenesis. *Lancet* 1999; **353**: 555-556.