

Vitrification du tissu ovarien : mythe ou réalité ?

Vitrification of ovarian tissue: myth or reality?

Elsa Labrune^{1,2,3}
Bruno Salle^{1,3,4}
Jacqueline Lornage^{1,3,4}

¹ Hospices civils de Lyon, hôpital Mère
Enfant, service de médecine de la reproduc-
tion, Bron, France

<elsa.labrune@chu-lyon.fr>

² Université Claude Bernard, faculté de
médecine Laennec, Lyon, France

³ Inserm U1208, Bron, France

⁴ Université Claude Bernard, faculté de
médecine Lyon Sud, Oullins, France

Résumé. La vitrification est une technique de cryoconservation employée en pratique courante pour conserver les embryons et les ovocytes. Dans le cadre de la préservation de la fertilité féminine, un certain nombre de patientes ne peuvent pas bénéficier d'une vitrification embryonnaire et/ou ovocytaire en raison de l'âge, de l'urgence du traitement ou encore du statut hormonal de la pathologie maligne. La technique proposée est la préservation du tissu ovarien qui est conservé par congélation lente. La vitrification serait une alternative intéressante sur le plan biologique, car elle pourrait améliorer les résultats actuels en termes de durée de vie des greffons, de qualité du tissu stromal en vue de réaliser une folliculogénèse *in vitro*, avec une reprise de la fonction ovarienne plus rapide. Sur le plan technique, la vitrification ne nécessite pas d'équipement coûteux. Le rêve d'une conservation de tissu ovarien vitrifié semble en train de se réaliser ; les travaux doivent se poursuivre.

Mots clés : tissu ovarien, vitrification, congélation lente, préservation de la fertilité féminine

Abstract. Vitrification is a cryopreservation technique already used in common practice to preserve embryos and oocytes. In the context of preserving female fertility, a number of patients cannot benefit from embryo and/or oocyte vitrification due to age, the urgency of treatment or the hormonal status of the malignant pathology. The proposed technique is the preservation of ovarian tissue which is preserved by slow freezing. Vitrification would be an interesting alternative from a biological point of view because it could improve the current results in terms of graft lifespan, currently a graft survival in monkeys of 18 months to 2 years has been reported, and quality of stromal tissue for *in vitro* folliculogenesis with faster recovery of ovarian function; and from a technical point of view because it does not require expensive equipment. The dream of vitrified ovarian tissue preservation seems to be coming true; work must continue.

Key words: ovarian tissue, vitrification, slow freezing, female fertility preservation

En France métropolitaine, l'incidence des cancers tous âges et sexes confondus, est estimée à 400 000 nouveaux cas en 2017 dont 46 % chez la femme – soit 186 000 cas. Le cancer du sein est le plus fréquent. Les taux de survie augmentent, pour la plupart des cancers, grâce à des diagnostics plus précoces et à l'amélioration des traitements. Plus spécifiquement, l'incidence des cancers dans la population pédiatrique est en moyenne de 1 756 nouveaux cas détectés par an de 2007 à 2011. Les hémopathies malignes représentent environ 39 % de ces cas. On estime qu'un enfant sur 460 sera atteint d'un cancer avant ses 15 ans, avec une survie à cinq ans des enfants diagnostiqués entre 2000 et 2011 allant de 75,1 % pour les tumeurs malignes osseuses à

98,9 % pour les rétinoblastomes [1]. Devant l'allongement de l'espérance de vie de ces jeunes filles et femmes, la médecine s'intéresse de plus en plus aux effets indésirables à long terme des traitements, notamment l'insuffisance ovarienne prématuro (IOP). La préservation de la fertilité féminine a aussi un intérêt pour certaines pathologies non tumorales telles que des hémopathies non malignes (e.g., drépanocytose sévère ou thalassémie majeure), ou des pathologies auto-immunes (e.g., lupus érythémateux disséminé sévère) qui exigent le recours à de la chimiothérapie et/ou à de la radiothérapie. Les chimiothérapies, ainsi que la radiothérapie, peuvent être gonadotoxiques [2], c'est pourquoi différentes stratégies de préservation de la fertilité existent.

Médecine
de la **Reproduction**

Tirés à part : E. Labrune

Techniques de préservation de la fertilité féminine

La plus ancienne est la cryoconservation d'embryons, qui consiste à préserver des embryons du couple dont la femme présente un risque d'IOP. Les principales limites sont la nécessité d'une stimulation de l'ovulation, qui n'est réalisable que chez les femmes pubères, en couple, et pour qui il n'y a pas une trop grande urgence à mettre en place le traitement. Une autre technique de préservation est la cryoconservation d'ovocytes. Elle permet aux femmes seules, pubères, de préserver leur fertilité. Ces deux techniques présentent des résultats satisfaisants depuis qu'elles recourent à la vitrification [3-8] ; ainsi sont-elles reconnues comme des méthodes de préservation de la fertilité féminine. La cryoconservation d'ovocytes est actuellement la méthode la plus utilisée [9]. Elle n'est cependant pas utilisable chez un certain nombre de patientes en raison de l'âge, de l'urgence du traitement ou encore du statut hormonal de la pathologie maligne. La technique proposée est la préservation du tissu ovarien, qui présente plusieurs avantages, en particulier, la non-nécessité d'une stimulation de l'ovulation [10]. L'étude de la congélation du tissu ovarien a débuté chez l'animal dans les années 1960. En 1954, Deanesly a congelé du tissu ovarien de rat qu'il a greffé chez des rattes ovariectomisées au préalable. Les greffons restaient fonctionnels [11]. Puis, en 1960, Parrott a obtenu la première grossesse chez la souris à partir de fragments de cortex congelés-décongelés et greffés [12]. S'en sont ensuivies des études chez des gros mammifères comme la brebis, afin de se rapprocher du tissu ovarien humain [13]. Gosden *et al.* ont ainsi obtenu la première grossesse chez la brebis en 1994 [14], et notre équipe a obtenu les premières naissances françaises chez la brebis en 2002 [15]. Les premières conservations de tissu ovarien humain ont débuté en 1995, dans le cadre de protocoles de recherche. C'est en 2004 que la première naissance vivante chez l'homme a été rapportée par Donnez *et al.* La grossesse naturelle a été obtenue onze mois après l'autogreffe de tissu ovarien congelé [16]. La cryoconservation puis la greffe de tissu ovarien ont permis la naissance de plus de 130 enfants dans le monde [17]. Une méta-analyse de 2017 rapporte des taux de reprise de l'activité ovarienne après autogreffe de 63,9 % et des taux de naissance vivante de 57,5 % [18]. Ces résultats ont permis de requalifier cette technique naguère « expérimentale » en technique « de routine » de préservation de la fertilité féminine.

Des limites subsistent, cependant, à cette technique de congélation lente, telles que la courte durée de vie des greffons et la non-reprise de greffons pourtant riches en follicules. La vitrification, qui est une technique permettant de conserver les tissus à l'état amorphe sans cristaux, serait une alternative à la congélation lente. Elle permettrait d'améliorer les résultats en termes de reprise du ou des

greffons et de grossesse, sachant que cette technique nous a permis d'obtenir, ces dernières années, des résultats très satisfaisants pour la conservation de l'ovocyte.

Congélation lente du tissu ovarien : méthode de référence

La technique de congélation lente est la plus utilisée pour le tissu ovarien humain. Elle consiste à passer de manière progressive d'un état liquide à un état solide. Le risque majeur de cette méthode est la formation de cristaux. En l'absence de milieu de congélation approprié, des cristaux extracellulaires se forment lors de la descente en température. Le milieu extracellulaire devient hypertonique et les cellules se déshydratent, entraînant des lésions intracellulaires. À l'inverse, une descente rapide en température permet de maintenir l'eau au sein des cellules, mais entraîne la formation de cristaux intracellulaires et donc des lésions cellulaires majeures. Un protocole de congélation lente est essentiel pour établir un équilibre entre les différents compartiments et limiter la formation de cristaux. Ce protocole se définit principalement par la composition du milieu de congélation utilisé et la vitesse à laquelle la température est abaissée. Le milieu permet un équilibrage progressif entre les cryoprotecteurs et le compartiment cellulaire aqueux. La vitesse de chute de la température est programmée et contrôlée grâce à un congélateur programmable. Les protocoles de congélation du tissu ovarien sont basés sur les travaux réalisés par Gosden *et al.* [14]. Ils sont variables selon les équipes. Le cryoprotecteur pénétrant le plus souvent utilisé est le diméthyl sulfoxyde (DMSO) [19]. La congélation-décongélation du tissu ovarien humain permet d'obtenir des résultats très satisfaisants ; elle présente cependant quelques limites, dont la courte durée de vie du greffon [20] et la présence de nombreux follicules vides au sein des greffons [21]. La durée de vie moyenne d'un greffon est de quatre à six ans [17]. Plusieurs études rapportent un effet négatif sur le tissu stromal, les cellules thécales et celles de la granulosa, probablement secondaire à la formation de cristaux [22-28]. L'alternative à la congélation lente qui limiterait la formation de cristaux est la vitrification, technique déjà utilisée en routine pour conserver embryons et ovocytes.

Vitrification : alternative à la congélation lente

La vitrification est le passage direct de l'état liquide à l'état solide amorphe, vitreux. Ce passage direct évite la formation de cristaux. Cette technique est séduisante sur le plan biologique et sur le plan technique car elle ne nécessite pas d'équipement coûteux et qu'elle est facile et rapide. La vitrification, puis le réchauffement, sont de

véritables défis cryobiologiques en raison de l'hétérogénéité du tissu. Il est difficile de maîtriser de façon uniforme les variations de température au sein de chaque type cellulaire. Les contraintes de la vitrification sont la vitesse de refroidissement, la viscosité du milieu et le volume de solution [29]. De ces contraintes découlent les facteurs influant la vitrification, à savoir : les cryoprotecteurs utilisés, le temps d'exposition, la taille du tissu et le support de vitrification [30]. Des études portant sur les propriétés physiques des solutions cryoprotectrices sont indispensables [31]. Les concentrations en cryoprotecteurs sont plus élevées que pour la congélation lente, et la descente en température est ultrarapide, de l'ordre de 5 000 °C par minute avant immersion dans l'azote liquide [32]. Ces fortes concentrations permettent d'augmenter la viscosité du milieu qui augmente la température de transition vitreuse et diminue la cristallisation. Cependant, à trop forte concentration, ces cryoprotecteurs peuvent être toxiques [33]. Les milieux de vitrification sont en général composés de plusieurs cryoprotecteurs afin de diminuer les concentrations de chaque molécule et donc de diminuer les effets toxiques. La taille du tissu est un facteur permettant d'optimiser la diffusion des cryoprotecteurs. En effet, plus la surface tissulaire et l'épaisseur sont réduites, plus les lésions sont faibles [34]. Les tailles optimales de tissu définies dans la littérature sont variables :

- de 2 × 2 × 0,5-1 mm à 3 × 3 × 5 mm chez le chat [34, 35],
- 3 × 3 × 0,5 mm chez le singe [36],
- 0,5-1 cm × 0,5-1 cm × 1 mm chez la femme [37].

Un échantillon de taille trop réduite expose à un risque d'altération du tissu, avec perte folliculaire. La dernière étape de la vitrification est le refroidissement ultrarapide dans l'azote liquide. Celui-ci peut être fermé – le tissu est alors déposé dans un système clos, protégeant le tissu du contact direct avec l'azote – ou ouvert – le tissu est directement en contact avec l'azote liquide. L'avantage du système ouvert est la facilité des échanges thermiques avec le tissu ; il est le plus utilisé par les équipes de recherche, car il permet de meilleurs résultats sur le tissu ovarien [22, 24, 37-39]. Un autre aspect important est l'étape de décongélation du tissu vitrifié. La vitesse de réchauffement doit être encore plus élevée que celle du refroidissement. Cette phase impose une contrainte sur la taille de l'échantillon inverse à celle qui s'exerçait pour la vitrification : un fragment tissulaire trop grand est exposé à un risque de cassure lors du réchauffement.

Résultats de la vitrification du tissu ovarien

De très nombreux paramètres sont à prendre en compte lors de la réalisation d'un protocole de vitrification-

réchauffement. La littérature montre que les milieux de vitrification utilisés par les diverses équipes sont multiples et difficilement comparables. La vitrification semble préférable à la congélation lente pour préserver les follicules de réserve et les cellules stromales [22-28]. Cependant, certains auteurs rapportent une supériorité de la congélation lente [40-44], et d'autres encore une équivalence entre les deux techniques [38, 45-51]. La vitrification du tissu ovarien n'est pas encore utilisée en pratique courante. Chaque équipe réalise ses propres tests afin de définir son protocole ; ainsi certaines vitrifient-elles des fragments de cortex ovarien en parallèle de la congélation lente, lors d'une autoconservation ovarienne chez la femme. Nous n'avons pas suffisamment de recul pour savoir si les taux de grossesses et de naissances vivantes après vitrification-réchauffement de tissu ovarien seront ou non meilleurs que ceux obtenus après congélation-décongélation. L'autre point important est la durée de vie du greffon vitrifié-réchauffé : un bénéfice attendu de la vitrification serait en effet de prolonger la durée de fonctionnement du greffon. Deux études conduites chez le singe ont rapporté des durées de vie de greffon de respectivement dix-huit mois et deux ans [36, 52]. La reprise de la fonction ovarienne était de un mois, plus courte que celle observée après greffe de tissu congelé-décongelé. Ce résultat est prometteur. Cependant, des dérégulations du système kit ligand/c-kit ont été observées, susceptibles d'influer la folliculogenèse et l'ovogenèse. Il est difficile de savoir si ces perturbations sont secondaires à la vitrification [52].

Conclusion

Les deux naissances vivantes, rapportées en 2015 [37], ainsi que les résultats chez les gros mammifères dont le singe permettent de penser que la technique de vitrification du tissu ovarien offrira une alternative intéressante à la congélation lente, et pourrait améliorer les résultats actuels. Le rêve d'une conservation du tissu ovarien vitrifié semble en train de se réaliser ; les travaux doivent cependant se poursuivre. Une amélioration de la technique de cryoconservation est obligatoire pour optimiser nos résultats et nous préparer à la folliculogenèse *in vitro* à partir de tissu ovarien frais, laquelle marque actuellement des progrès. La vitrification a montré de meilleurs résultats pour la culture tridimensionnelle de follicules préantraux chez la souris [53].

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Survie [Internet]. <http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/epidemiologie/survie> [cited 2019 Sep. 9].

2. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, *et al.* American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Am Soc Clin Oncol* 2006 ; 24 : 2917-31.
3. Antinori M, Licata E, Dani G, *et al.* Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reprod Biomed Online* 2007 ; 14 : 72-9.
4. Cao Y-X, Xing Q, Li L, *et al.* Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertil Steril* 2009 ; 92 : 1306-11.
5. Fadini R, Brambillasca F, Renzini MM, *et al.* Human oocyte cryopreservation: comparison between slow and ultrarapid methods. *Reprod Biomed Online* 2009 ; 19 : 171-80.
6. Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, *et al.* Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril* 2010 ; 94 : 2088-95.
7. Martino NA, Dell'aquila ME, Cardone RA, *et al.* Vitrification preserves chromatin integrity, bioenergy potential and oxidative parameters in mouse embryos. *Reprod Biol Endocrinol* 2013 ; 11 : 27.
8. Yu L, Jia C, Lan Y, *et al.* Analysis of embryo intactness and developmental potential following slow freezing and vitrification. *Syst Biol Reprod Med* 2017 ; 63 : 285-93.
9. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. . Ovarian tissue cryopreservation: a committee opinion. *Fertil Steril* 2014 ; 101 : 1237-43.
10. Levine JM, Kelvin JF, *et al.* Infertility in reproductive-age female cancer survivors. *Cancer* 2015 ; 121 : 1532-9.
11. Deanesly R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *J Endocrinol* 1954 ; 11 : 197-200.
12. Parrott MVD. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *Hum Reprod* 1960 ; 1 : 230-41.
13. Demirci B, Lornage J, Salle B, *et al.* Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. *Fertil Steril* 2001 ; 75 : 754-62.
14. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, *et al.* Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Hum Reprod* 1994 ; 9 : 597-603.
15. Salle B, Demirci B, Franck M, *et al.* Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil Steril* 2002 ; 77 : 403-8.
16. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, *et al.* Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004 ; 364 : 1405-10.
17. Donnez J, Dolmans M-M. Fertility Preservation in Women. *N Engl J Med* 2018 ; 378 : 400-1.
18. Pacheco F, Oktay K. Current Success and Efficiency of Autologous Ovarian Transplantation: A Meta-Analysis. *Reprod Sci* 2017 ; 24 : 1111-20.
19. Rivas Leonel EC, Lucci CM, Amorim CA. Cryopreservation of Human Ovarian Tissue: A Review. *Transfus Med Hemotherapy* 2019 ; 46 : 173-81.
20. Donnez J, Silber S, Andersen CY, *et al.* Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. a review of 13 live births. *Ann Med* 2011 ; 43 : 437-50.
21. Amorim CA, David A, Dolmans M-M, *et al.* Impact of freezing and thawing of human ovarian tissue on follicular growth after long-term xenotransplantation. *J Assist Reprod Genet* 2011 ; 28 : 1157-65.
22. Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodríguez B, *et al.* Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertil Steril* 2014 ; 101 : 775-84.
23. Keros V, Xella S, Hultenby K, *et al.* Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009 ; 24 : 1670-83.
24. Sanfilippo S, Canis M, Smitz J, *et al.* Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. *Reprod Biol Endocrinol* 2015 ; 13 : 67.
25. Xiao Z, Wang Y, Li L-L, *et al.* *In vitro* culture thawed human ovarian tissue: NIV versus slow freezing method. *Cryo Letters* 2013 ; 34 : 520-6.
26. Chang HJ, Moon JH, Lee JR, *et al.* Optimal condition of vitrification method for cryopreservation of human ovarian cortical tissues. *J Obstet Gynaecol Res* 2011 ; 37 : 1092-101.
27. Xiao Z, Wang Y, Li L, *et al.* Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. *Fertil Steril* 2010 ; 94 : 2323-8.
28. Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, *et al.* *In vitro* development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. *Hum Reprod* 2011 ; 26 : 2461-72.
29. Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 2007 ; 67 : 81-9.
30. Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987 ; 24 : 387-402.
31. Courbiere B, Odagescu V, Baudot A, *et al.* Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols. *Fertil Steril* 2006 ; 86 : 1243-51.
32. Fahy GM. Vitrification: a new approach to organ cryopreservation. *Prog Clin Biol Res* 1986 ; 224 : 305-35.
33. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, *et al.* Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984 ; 21 : 407-26.
34. Lu X-L, Yu J, Zhang G, *et al.* Effects of varying tissue sizes on the efficiency of baboon ovarian tissue vitrification. *Cryobiology* 2014 ; 69 : 79-83.
35. Gorricho CM, Tavares MR, Apparício M, *et al.* Vitrification of cat ovarian tissue: does fragment size matters. *Reprod Domest Anim Zuchthyg* 2018 ; 53 : 125-32.
36. Suzuki N, Hashimoto S, Igarashi S, *et al.* Assessment of long-term function of heterotopic transplants of vitrified ovarian tissue in cynomolgus monkeys. *Hum Reprod* 2012 ; 27 : 2420-9.
37. Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, *et al.* Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients

with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod* 2015 ; 30 : 608-15.

38. Fabbri R, Vicenti R, Macciocca M, et al. Morphological, ultrastructural and functional imaging of frozen/thawed and vitrified/warmed human ovarian tissue retrieved from oncological patients. *Hum Reprod* 2016 ; 31 : 1838-49.

39. Klocke S, Bündgen N, Köster F, et al. Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Arch Gynecol Obstet* 2015 ; 291 : 419-26.

40. Abir R, Fisch B, Fisher N, et al. Attempts to improve human ovarian transplantation outcomes of needle-immersed vitrification and slow-freezing by host and graft treatments. *J Assist Reprod Genet* 2017 ; 34 : 633-44.

41. Lee S, Ryu K-J, Kim B, et al. Comparison between slow freezing and vitrification for human ovarian tissue cryopreservation and xenotransplantation. *Int J Mol Sci* 2019 ; 20 : E3346.

42. Vatanparast M, Khalili MA, Yari N, et al. Evaluation of sheep ovarian tissue cryopreservation with slow freezing or vitrification after chick embryo chorioallantoic membrane transplantation. *Cryobiology* 2018 ; 81 : 178-84.

43. Oktem O, Alper E, Balaban B, et al. Vitrified human ovaries have fewer primordial follicles and produce less antimüllerian hormone than slow-frozen ovaries. *Fertil Steril* 2011 ; 95 : 2661-4.

44. Gandolfi F, Paffoni A, Papasso Brambilla E, et al. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril* 2006 ; 85 : 1150-6.

45. Amorim CA, Dolmans M-M, David A, et al. Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. *Fertil Steril* 2012 ; 98 : 1291-8.

46. Huang L, Mo Y, Wang W, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008 ; 139 : 193-8.

47. Wang Y, Xiao Z, Li L, et al. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Hum Reprod* 2008 ; 23 : 2256-65.

48. Li Y, Zhou C, Yang G, et al. Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues. *Chin Med J* 2007 ; 120 : 110-4.

49. Zhou X-H, Zhang D, Shi J, et al. Comparison of vitrification and conventional slow freezing for cryopreservation of ovarian tissue with respect to the number of intact primordial follicles: A meta-analysis. *Medicine* 2016 ; 95 : e4095.

50. Campos ALM, Guedes J, de S, Rodrigues JK, et al. Comparison between Slow Freezing and Vitrification in Terms of Ovarian Tissue Viability in a Bovine Model. *Rev Fed Bras Soc Ginecol E Obstet* 2016 ; 38 : 333-9.

51. Rahimi G, Isachenko E, Isachenko V, et al. Comparison of necrosis in human ovarian tissue after conventional slow freezing or vitrification and transplantation in ovariectomized SCID mice. *Reprod Biomed Online* 2004 ; 9 : 187-93.

52. Amorim CA, Donnez J, Dehoux J-P, et al. Long-term follow-up of vitrified and autografted baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *Hum Reprod* 2019 ; 34 : 323-34.

53. Asgari F, Valojerdi MR, Ebrahimi B, et al. Three dimensional in vitro culture of preantral follicles following slow-freezing and vitrification of mouse ovarian tissue. *Cryobiology* 2015 ; 7 : 529-36.