

# **Conception d'une structure nanométrique (scaffold) pour la greffe de follicules ovariens afin de préserver la fertilité des patientes cancéreuses.**

## **1. INTRODUCTION**

### 1.1. Cryopréservation et transplantation de tissu ovarien

Grâce aux progrès dans le domaine oncologique, l'espérance de vie des jeunes patientes cancéreuses a fortement augmenté. Malheureusement, les traitements chimio- et radiothérapeutiques peuvent causer une défaillance ovarienne précoce et une perte irréversible de la fertilité, entraînant des effets majeurs sur leur qualité de vie à long terme.

Notre projet est centré sur le développement des techniques de cryopréservation et d'autogreffe ovariennes

[1-4]. La greffe des fragments ovariens après décongélation permet la restauration de la fonction ovarienne,

endocrinienne et ovulatoire, et dans quelques cas, a permis également une restauration de la fertilité [1].

Cependant, la perte de follicules après greffe, due à l'ischémie, et le risque de retransmission de la pathologie tumorale sont des facteurs limitant l'application de cette technique à certaines indications cliniques. En cas de transplantation de fragments corticaux ou d'ovaire entier, il existe un risque de réimplanter des cellules malignes, et plus particulièrement dans les leucémies et les cancers du sein. C'est pourquoi, il est essentiel de développer des techniques alternatives à la transplantation de tissu ovarien cortical. La transplantation de follicules ovariens isolés constitue une alternative prometteuse pour ces patientes [5].

### 1.2. Isolement et greffe de follicules ovariens humains : premiers résultats

Cette approche a permis la restauration de la fertilité chez la souris [6] et les protocoles d'isolement

enzymatique et de récupération de follicules humains que nous avons optimisés permettent désormais de

l'envisager chez l'humain [5, 7]. Nos travaux récents ont démontré que les follicules humains pré-antraux sont capables de croître après xénogreffe chez la souris et de se développer jusqu'au stade antral cinq mois post-transplantation, après stimulation par la FSH [8, 9]. Lorsque les follicules inclus dans un caillot

plasmatique sont transplantés au niveau de la bourse ovarienne murine, on observe la reformation d'une structure de type stromal avec une organisation cellulaire et une vascularisation similaires à celle d'un ovaire normal qui semblent fournir le support indispensable au développement folliculaire [9].

Ce modèle de greffe présente cependant certains désavantages limitant l'application de cette approche novatrice: la technique de greffe du caillot plasmatique est peu reproductible, le caillot est difficile à manipuler, les concentrations élevées de sérum sont cytotoxiques et l'absence de certains facteurs essentiels à la régulation de la folliculogénèse semble entraîner une déplétion prématurée du pool folliculaire [8]. La conception par «electrospinning» d'une structure nanométrique («scaffolds») stimulant et régulant la reconstruction du tissu ovarien devrait permettre de pallier ces inconvénients.

### 1.3. Electrospinning de nanofibres et scaffold de reconstruction tissulaire

L'"electrospinning" est une méthode simple, efficace et relativement peu coûteuse pour produire des fibres polymériques dont le diamètre se situe dans le domaine de quelques nano- à quelques micromètres en utilisant un jet de polymère, fondu ou en solution, induit par un champ électrique [10,11,12]. Il en résulte un dépôt de fibres ultrafines (nano) sous forme de structure non tissée de large surface, présentant une porosité élevée, des capacités d'absorption importantes et une surface très plane.

Jusqu'à présent, des méso- et nanofibres ont été produites de cette façon à partir d'un grand nombre de

matériaux, incluant des polymères conventionnels [10, 12, 13], des polymères de fibres textiles [14], des

polymères biodégradables et biocompatibles [15], des protéines [16], des peptides [17], etc. Il est également possible d'incorporer des composés magnétiques, optiques ou biologiques dans la matrice polymérique pour créer des nanofibres multifonctionnelles. Des nanoparticules peuvent être ajoutées aux solutions destinées à l' "electrospinning" pour produire des nanofibres fonctionnalisées [18-23].

Il y a un potentiel énorme dans l'utilisation de nanofibres produites par « electrospinning » (p.ex. à partir de fibrinogène) pour développer des échafaudages (« scaffold») nanométriques stimulant et dirigeant la reconstruction de tissus et d'organes [24-29]. Les propriétés intrinsèques biologiques et mécaniques de ces échafaudages en font d'excellents candidats pour des applications sur tissus souples qui demandent un haut degré d'extensibilité. Les « feutres » non-tissés de nanofibres obtenus par "electrospinning" sont bien connus pour leurs structures poreuses larges et interconnectées. Ils représentent donc une classe de matériaux bien adaptés pour mimer les matrices extracellulaires, ce qui constitue un atout important dans le support à la reconstruction tissulaire.

## **1. OBJECTIFS**

L'objectif de ce projet est de développer une matrice pour la greffe de follicules humains isolés reproduisant l'environnement ovarien et fournissant les facteurs indispensables au développement folliculaire jusqu'au stade ovulatoire. Cette structure devrait permettre de greffer des follicules isolés chez des patientes afin de restaurer leur fertilité après guérison du cancer. Ce concept appuyé par les travaux de notre laboratoire a fait l'objet d'une déclaration d'invention.

## **2. STRATEGIE EXPERIMENTALE**

Plus spécifiquement, ce projet impliquera le développement d'un « scaffold » qui constituera une matrice pour la greffe des follicules mais également un substitut temporaire de la matrice extracellulaire ovarienne native, essentielle à la survie et la croissance folliculaire.

Un défi crucial dans la conception des scaffolds sera de simuler autant que possible la fonctionnalité de la

matrice extra-cellulaire (ECM) du tissu naturel. Les cellules sont sensibles à la topographie et à la composition chimique de l'ECM. Une matrice idéale devrait fournir une base adhésive adéquate pour les interactions cellule-matrice. Afin de doter le scaffold de sites d'adhésions, sa surface sera fonctionnalisée par le greffage de molécules biologiques favorisant cette adhésion : laminine, fibronectine, fibrinogène, collagène, gélatine ou chitosane. Des facteurs solubles paracrines sont

également requis pour contrôler le développement du follicule et lui permettre une adaptation phénotypique adéquate aux modifications de son environnement tissulaire en modulant l'angiogenèse, le recrutement cellulaire, la production d'ECM, la différenciation et la prolifération cellulaire. A cette fin, des nanofibres libérant des cytokines/chémokines/ facteurs de croissance seront conçues et incorporées au scaffold.

Les ECMs, membranes basales et leurs pores interconnectés sont de dimensions nanométriques. Le choix de la technique d'electrospinning en tant que méthode aisée et versatile pour obtenir des scaffolds constitués de nanofibres est dicté par cette constatation. Cette technique permet en effet de réaliser un scaffold "sur mesure" en faisant varier quelques-uns des principaux paramètres matriciels: porosité, distribution des dimensions des pores, leur orientation et leur interconnectivité, affectant ainsi la distribution cellulaire et le transport de tous les facteurs solubles qui leur sont destinés ou qui en sont issus.

Enfin, le follicule, au cours de son développement, subit une croissance considérable et le scaffold devra

accommoder ces changements dimensionnels importants tout en maintenant un support mécanique minimal. Cette contrainte nécessite un scaffold de structure « évolutive », qui sera obtenu par un mélange de nanofibres de natures différentes. Une solution envisagée est l'incorporation de nanofibres constituées de polymères à dégradation rapide, qui induiront une augmentation progressive de la taille des pores. Durant le processus d'electrospinning, ces nanofibres seront intimement mêlées à un second type de nanofibres constituées de polymères à dégradation lente, qui fourniront le support mécanique stable au follicule.

Le réseau de nanofibres mélangées sera formaté en scaffolds de dimensions adaptées à l'implantation et lui conférera une porosité et une interconnectivité optimale. L'efficacité des scaffolds sera estimée sur base du développement folliculaire, des phénomènes cellulaires et tissulaires signant l'adaptation du microenvironnement du follicule implanté et, finalement des réponses obtenues in vivo.

## **4. REALISATION DU PROJET**

### 4.1.Contexte général

Le laboratoire de gynécologie de l'UCL (Unité GYNE) constitue un environnement idéal pour la réalisation de ce projet : il est proche de la clinique tout en disposant de l'infrastructure indispensable à la culture cellulaire, l'histologie, la microscopie, l'analyse d'image et la biologie moléculaire. De plus, nous bénéficions de l'expertise des laboratoires voisins dont, en particulier, le laboratoire d'Anatomopathologie clinique de l'UCL (Prof. Rahier et Prof. Marbaix) pour l'analyse histologique et de microscopie électronique, le laboratoire du Prof. Courtoy pour la microscopie confocale. Au laboratoire, nous travaillons en équipe pluridisciplinaire (gynécologue, vétérinaire, biochimiste et biologiste), en étroite collaboration avec l'équipe de cliniciens des services de gynécologie, d'hématologie et d'oncologie des Cliniques Saint-Luc.

### 4.2 Démarche expérimentale

Le développement du "scaffold" impliquera trois phases visant à (1) sélectionner le type de polymère en fonction de sa dégradabilité et de sa biocompatibilité (2) évaluer sa bioactivité après greffe à long terme et (3) optimiser sa fonctionnalité par l'inclusion d'agents régulateurs.

#### 4.2.1.Sélection des composants du scaffold

*a. Cinétique de dégradation.* Au cours de cette première phase, les polymères constituant le scaffold seront sélectionnés et leur structure et taille seront définies en fonction de leur cinétique de dégradation. Dans cette optique, différents types d'homopolymères seront évalués ainsi que leurs copolymères dérivés (par exemple les polylactide-co-glycolide à cinétique de dégradation ajustable). Les scaffolds seront produits et formatés par le centre d'étude et de recherche sur les macromolécules (CERM, Liège). L'élaboration du scaffold devra tenir compte de la complexité structurelle de la matrice extra-cellulaire native et permettre l'adhésion cellules-matrice et les interactions cellulaires [16, 17]. La cinétique de dégradation du scaffold sera d'abord caractérisée *in vitro* par l'évaluation de son poids, son épaisseur et sa morphostructure. L'influence de la dégradation sur le pH environnant sera également mesurée.

*b. Biocompatibilité du scaffold avec les follicules isolés et avec l'hôte.* L'organisation des follicules au sein du scaffold et leur compatibilité avec la matrice polymérique sera d'abord évaluée *in vitro*. Les follicules humains inclus dans le scaffold seront mis en culture pendant 7 jours. Pour cela, les follicules seront isolés et récupérés à partir de tissu ovarien humain cryopréservé selon le protocole standard du laboratoire GYNE. Le protocole de culture des follicules isolés que nous venons de développer sera appliqué pour la mise en culture du scaffold. L'adhésion des follicules au sein du scaffold pourrait si nécessaire être optimisée par l'inclusion dans les fibres du scaffold de molécules d'adhésion telles que le chitosan, la laminine ou la gélatine. Les critères d'évaluation classique de viabilité et d'intégrité folliculaires seront utilisés: l'histologie, l'apoptose (marquage TUNEL et caspase 3), la prolifération cellulaire (marquage Ki-67) et la viabilité.

Pour évaluer la biocompatibilité du scaffold avec l'hôte, nous utiliserons un modèle expérimental de greffe du au niveau de l'ovaire de mouton. Le modèle mouton a été choisi étant donné les similitudes entre l'ovaire ovin et humain du point de vue de la taille et de la composition du stroma [30, 31]. Le scaffold contenant les follicules humains sera greffé au niveau de l'ovaire ovin selon le protocole opératoire appliqué en clinique pour la greffe de cortex ovarien [4]. Un traitement immunosuppresseur à la cyclosporine sera appliqué afin de permettre la greffe du tissu humain. La tolérance de l'hôte vis-à-vis du scaffold greffé sera évaluée par la détection des cellules inflammatoires au sein du greffon et le dosage du fibrinogène sanguin.

#### 4.2.2. Evaluation de la fonctionnalité du scaffold incluant les follicules isolés

Après avoir sélectionné un scaffold biodégradable et biocompatible, nous analyserons sa fonctionnalité après greffe pour une période de 6 mois. Les paramètres suivants seront évalués: la population folliculaire (distribution des follicules selon leur stade), la croissance folliculaire (prolifération cellulaire), l'apoptose et la population stromale (nombre et répartition des cellules). Nous examinerons également si le degré d'inflammation et de vascularisation sont corrélés [32]. La néovascularisation sera caractérisée par l'immunomarquage du VEGF, du CD34 et de l'ASMA et par l'analyse morphométrique du réseau vasculaire. Ces expériences de greffe permettront également d'éprouver la plasticité du scaffold au cours de la croissance folliculaire et sa cinétique de dégradation *in vivo*. Il sera essentiel d'obtenir une bonne corrélation entre la cinétique de dégradation (et/ou l'élasticité du scaffold) et le développement folliculaire.

#### 4.2.3. Optimisation de la fonctionnalité du scaffold incluant les follicules isolés

Les 2 premières étapes devraient permettre l'élaboration d'un modèle de scaffold intégrant une architecture tridimensionnelle de nanofibres avec des propriétés de surface adhésives servant de matrice à la greffe de follicules isolés et permettant la formation d'une structure tissulaire

ovarienne fonctionnelle. L'étape suivante consistera à optimiser la fonctionnalité de cette structure par une meilleure coordination de la folliculogenèse et un meilleur contrôle de la revascularisation.

La fonctionnalité du scaffold pourra être améliorée par l'inclusion de molécules bioactives dans les nanofibres régulant la folliculogenèse positivement (tels que l'insuline, les « bone morphogenetic protein 4 et 7 », le growth differentiation factor 9) ou négativement (telle que l'hormone anti-Müllerienne) [33] ainsi que de facteurs protecteurs du stress ischémique (tels que l'acide ascorbique, la vitamine E ou la pentoxifylline) et inducteurs de la néovascularisation, (tels que le facteur de croissance vasculaire endothélial, l'angiopoiétine et le «platelet derived growth factor»).

## **5. PERSPECTIVES ET IMPLICATIONS POTENTIELLES POUR L'ONCOLOGIE CLINIQUE**

Nos travaux de recherche auront un impact majeur sur la qualité de vie des jeunes patientes ménopausées ou infertiles suite à un traitement chimio et/ou radiothérapeutique. Il est important de souligner que chez la femme la préservation de la fertilité après traitement anti-cancéreux est encore en phase de développement expérimental, tandis que chez l'homme, la congélation de sperme avant chimiothérapie est appliquée en routine.

Les résultats prometteurs obtenus par notre équipe dans le domaine de la cryopréservation et de la greffe du tissu ovarien démontrent l'applicabilité de cette approche en clinique, donnant un immense espoir aux patientes. Pouvoir procréer et maintenir une production hormonale naturelle ont un impact psychologique majeur pour ces patientes. Ces techniques demeurent cependant expérimentales et ne peuvent être appliquées pour toutes les pathologies. En particulier, la réimplantation de tissu ovarien ne peut être envisagée lorsqu'il existe un risque de présence de cellules cancéreuses dans le tissu ovarien. Ce projet interdisciplinaire visant à développer un scaffold pour greffer des follicules isolés ouvre de nouvelles perspectives pour préserver la fertilité d'un nombre croissant d'adolescentes et de jeunes patientes cancéreuses.

## **6. REFERENCES**

1. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D et al. *Lancet* 364:1405-1410 (2004)
2. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D et al. *Hum Reprod* 21:183-188 (2006)
3. Donnez J, Dolmans MM, Pirard C et al. *Hum Reprod* 22:2653-2659 (2007)
4. Donnez J, Squifflet J, Van Eyck AS et al. *Reprod Biomed Online*, sous presse.
5. Dolmans MM, Michaux N, Camboni A et al. *Hum Reprod* 21:413-420, (2006)
6. Carroll J, Gosden RG. *Hum Reprod*, 8:1163-1167 (1993)
7. Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A et al. *Fertil Steril* 82:1648-1653 (2004).
8. Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Gadsseux E et al. *Reproduction* 134:253-262 (2007).
9. Dolmans MM, Yuan WY, Camboni A et al. *Reprod Biomed Online*, sous presse.
10. DH Reneker, I Chun. *Nanotechnology* 7: 216 (1996)
11. L Larronda, John Manley RS. *J Polym Sci: Polym Phys* 19: 909 (1981)
12. A Formhals, US Patent. 1.975.504, 1934
13. Li Dand, Xia Y. *Adv Mater* 16: 1151 (2004)
14. HJ Jin, GC Rutledge, DL Kaplan. *Polym Prepr* 43: 743 (2002)
15. ST Tan, JH Wendorff, C Pietzonka, ZH Jia, GQ Wang. *Chem Phys Chem* 6: 1461 (2005)
16. CJ Buchko, LC Chen, Y Shen, DC Matin. *Polymer* 40: 7397 (1999)
17. JA Matthews, GE Wnek, DG Simpson, GL Bowlin. *Biomacromolecules* 3: 232 (2002)

18. A Pedicini, RJ Farris. *J Polym Sci B: Polym Phys* 42:752 (2004)
19. H Hou, Z Jun, A Reuning, A Schaper, JH Wendorff, A Greiner. *Macromolecules* 35: 2429 (2002)
20. QB Yang, DM Li, YL Hong, ZY Li, C Wang, SL Qiu, et al. *Synth Met* 137: 972 (2003)
21. H Hou, DH Reneker. *Adv Mater* 16:69 (2004)
22. YK Luu, K Kim, BS Hsiao, B Chu, M Hadjiargyroua. *J Controlled Rel* 89: 341 (2003)
23. J Zeng, X Xu, X Chen, Q Liang, X Bian, L Yang, et al. *J Controlled Rel* 92: 227 (2003)
24. MS Khil, SR Bhattarai, HY Kim, et al. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 72B:117 (2005)
- Nouveau projet de recherches - 7.4.568.08F - Page 15
25. TA Telemeco, C Ayres, GL Bowlin et al. *Acta Biomater* 1:377 (2005)
26. CM Vaz, SV Tuijl, CVC Bouten, FPT Baaijens. *Acta Biomater* 1:575 (2005)
27. ED Boland, BD Coleman, CP Barnes et al. *Acta Biomater* 1:115 (2005)
28. D Katti, KW Robinson, FK Ko, CT Laurencin. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 70B:286 (2004)
29. ZM Huang, CL He, A Yang, Y Zhang, XJ Han, J Yin, et al. *J Biomed Mater Res* 77A:169
30. Newton H, Picton H, Gosden RG. *J Reprod Fertil* 115:141-150 (1999)
31. Oktay K, Karlikaya GG, Aydin BA. *Mol Cell Endocrinol* 169:105-108 (2000)
32. Sung H-J, Meredith C, Johnson C, Galis ZS. *Biomaterials* 25:5735-5742 (2004)
33. Skinner MK. *Hum Reprod Update* 11:461-71 (2005)

#### Liste des publications des membres du groupe projet liées au sujet

1. Donnez J, Bassil S. (1998) Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Hum Reprod Update*. 4:248-59.
2. Donnez J., Godin P.A., Qu J., Nisolle M. (2000) Gonadal cryopreservation in the young patient with gynaecological malignancy. *Cur Opin Obstet Gynecol* 12, 1-9.
3. Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J, Motta P, Donnez J. (2000) Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril*. 74:122-9.
4. Qu J, Godin PA, Donnez J. (2000) Expression of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Fertil. Steril*. 74 : 113-121.
5. Qu J, Godin PA, Nisolle M, Donnez J.(2000) Distribution and epidermal growth factor receptor expression of primordial follicles in human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Hum Reprod*. 15:302-10.
6. Qu J, Godin PA, Nisolle M, Donnez J. (2000) Expression of receptors for insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta in human follicles. *Mol Hum Reprod* 6:137-45.
7. Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrere S, Donnez J. (2004) Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril*. 82:1390-4.
8. Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrere S, Van Eyck AS, Donnez J. (2004) Ficoll density gradient method for recovery of isolated human ovarian primordial follicles. *Fertil Steril* 82:1648-53.

9. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A. (2004) Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 364(9443):1405-10.
10. Donnez J, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Demylle D, Van Langendonck A. (2005) The role of cryopreservation for women prior to treatment of malignancy. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 17:333-8.
11. Dolmans MM, Demylle D, Martinez-Madrid B, Donnez J (2005) Efficacy of in vitro fertilization after chemotherapy. *Fertil Steril* 83:897-901.
12. Donnez J, Squifflet J, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck A. (2005) Orthotopic transplantation of fresh ovarian cortex: a report of two cases. *Fertil Steril.* 84:1018.
13. Dolmans MM, Michaux N, Camboni A, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A, Nottola SA, Donnez J. (2006) Evaluation of Liberase, a purified enzyme blend, for the isolation of human primordial and primary ovarian follicles. *Hum Reprod.* 21:413-20.
14. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A (2006) Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anaemia: case report. *Hum Reprod* 21:183-8.
15. Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck A, Demylle D, Dolmans MM. (2006) Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update* 12(5):519-35.
16. Donnez J, Dolmans MM, Pirard C, Van Langendonck A, Demylle D, Jadoul P, Squifflet J. (2007) Allograft of ovarian cortex between two genetically non-identical sisters: Case Report. *Hum Reprod.* 22(10):2653-9.
17. Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Gadisseux E, Guiot Y, Yuan WY, Torre A, Camboni A, Van Langendonck A, Donnez J. (2007) Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. *Reproduction.* 134(2):253-62.
18. Jadoul P, Donnez J, Dolmans MM, Squifflet J, Lengele B, Martinez-Madrid B (2007) Laparoscopic ovariectomy for whole human ovary cryopreservation: technical aspects. *Fertil Steril* 87(4):971-5.
19. Martinez-Madrid B, Camboni A, Dolmans MM, Nottola S, Van Langendonck A, Donnez J. (2007) Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. *Fertil Steril.* 87(5):1153-65.
20. Nottola SA, Camboni A, Van Langendonck A, Demylle D, Macchiarelli G, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Correr S, Donnez J (2007) Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. *Fertil Steril.* sous presse
21. Camboni A, Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Nottola S, Van Langendonck A, Donnez, J (2007) Autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue in a young woman: ultrastructure and viability of grafted tissue. *Fertil Steril* sous presse

22. Dolmans MM, Wu YY, Camboni A , Torre A, Van Langendonck A, Martinez-Madrid B, Donnez J Isolated human primordial follicles can develop to the antral stage after xenografting to SCID mice. RBM online, accepté
23. Martinez-Madrid B, Donnez J, Van Eyck A-S, Veiga-Lopez A, Dolmans MM, Van Langendonck A. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model: a useful tool to study short-term transplantation of cryopreserved human ovarian tissue. Fertil Steril, accepté
24. Donnez J, Squifflet J, Van Eyck A-S, Demylle D, Jadoul P, Van Langendonck A, Dolmans MM. Restoration of ovarian function in orthotopically transplanted cryopreserved ovarian tissue: a pilot experience. RBM online, accepté.
25. Amorim CA, Donnez J. Survival of human preantral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in calcium alginate matrix : preliminary results. Biomaterials soumis