

Comment minimiser les risques sur la fertilité des traitements du cancer du sein chez les femmes jeunes ? Quoi de neuf en matière de préservation de la fertilité ?

How reducing the risks for fertility of breast cancer treatments in young women? What's new in fertility preservation?

J. Flandrin¹, C. Sonigo^{2,3}, M. Grynberg^{2,4,5}

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme en âge de procréer. Les progrès thérapeutiques constants permettent aujourd'hui à ces femmes d'envisager un avenir reproductif. Cette thématique fait donc partie intégrante des sujets traités lors des différents plans cancer ce qui a permis de mettre en place des circuits de prise en charge et un accès rapide à des méthodes de préservation de la fertilité (PF). En effet, la question de la fertilité après cancer est primordiale à aborder avant de commencer le traitement potentiellement gonadotoxique, mais la PF ne doit pas retarder la prise en charge du cancer et avoir une répercussion sur le pronostic de la patiente. L'impact de la prise en charge du cancer du sein sur la fertilité féminine est d'une part secondaire à la gonadotoxicité de la chimiothérapie qui altère le stock de follicules primordiaux et d'autre part la conséquence du vieillissement ovarien physiologique durant l'intervalle de temps entre les traitements et l'autorisation de démarrer une grossesse.

Voici un point sur les possibilités de PF des patientes jeunes atteintes d'un cancer du sein et les avancées récentes de ces différentes techniques. L'amélioration des méthodes actuellement disponibles et le développement de nouvelles stratégies représentent un enjeu majeur en oncofertilité.

à distance du cancer et des options disponibles de PF. Cette consultation doit intervenir au plus tôt après le diagnostic afin d'être optimale dans la prise en charge tout en laissant un temps de la réflexion à la patiente et sans retarder l'initiation des traitements du cancer.

La consultation d'oncofertilité doit être facilement accessible via une ligne téléphonique dédiée, avec un personnel entraîné (médecin de la reproduction, sage-femme, infirmière, psychologue, embryologiste) afin de garantir une prise en charge de qualité. Un des objectifs de cette consultation est de définir la demande de la patiente quant à l'existence d'un projet parental actuel ou futur et d'évaluer la réserve ovarienne. C'est également le moment où sont abordés le phénomène de vieillissement ovarien physiologique et l'impact des traitements anticancéreux sur la fonction ovarienne, les techniques de PF, leurs limites, ainsi que les enjeux relatifs à leur future utilisation. Toute décision de PF nécessite une communication avec l'équipe oncologique qui suit la patiente. Un délai de réflexion est systématiquement laissé à la patiente ou au couple, afin de pouvoir prendre une décision éclairée et mûrie. Enfin, il convient de prévenir les patientes du risque d'échec potentiel de chaque technique.

¹ Unité de gynécologie adolescente et jeune adulte, hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre.

² Service de médecine de la reproduction et préservation de la fertilité, hôpital Antoine-Béclère, Clamart.

³ Unité Inserm 1185, université Paris-Sud, université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre.

⁴ Université Paris-Sud, université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre.

⁵ Unité Inserm U1133, université Paris-Diderot, Paris.

Consultation de préservation de la fertilité

Toutes les patientes en âge de procréer devant recevoir une chimiothérapie et/ou une hormonothérapie doivent être informées, au cours d'une consultation spécialisée, des risques potentiels d'infertilité

Évaluation des risques d'infertilité postcancer

Comment évaluer la fertilité postcancer ?

Tout d'abord, il ne faut pas confondre fertilité et réserve ovarienne. En effet, s'il est possible d'évaluer

Résumé

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes en âge de procréer, mais l'amélioration des traitements permet à ces patientes d'envisager un avenir reproductif. Proposer une préservation de la fertilité est indispensable en amont d'un traitement potentiellement gonadotoxique et retardant le projet de grossesse. Une consultation dédiée devra être réalisée au plus vite après le diagnostic, afin d'informer la patiente sur l'impact des traitements sur la fonction ovarienne et de discuter des possibilités de la préservation de la fertilité. La cryoconservation ovocytaire ou embryonnaire ou celle de tissu ovarien sont désormais proposées en routine. Par ailleurs, diverses molécules visant à protéger le pool folliculaire des effets gonadotoxiques de la chimiothérapie sont en cours de développement, avec des résultats prometteurs.

Mots-clés

Cancer du sein
Oncofertilité
Préservation de la fertilité
Cryoconservation

la réserve ovarienne, les paramètres utilisés ne sont en rien synonyme de fertilité. En effet, les marqueurs de la réserve ovarienne, qu'ils soient biologiques (FSH et estradiol au 3^e jour du cycle, AMH et inhibine B) ou échographiques (CFA (comptage des follicules antraux) par échographie endovaginale), sont le reflet de la quantité et non de la qualité des ovocytes présents dans les ovaires.

De nombreuses études ont tenté d'évaluer la fertilité à l'issue des traitements gonadotoxiques. Dans la majorité des cas, l'aménorrhée ou la résurgence des cycles après traitement a été évaluée. Une période d'aménorrhée peut être transitoire, puis les cycles peuvent réapparaître dans les 12 à 36 mois suivant l'arrêt du traitement. Il est toutefois important de noter que la réserve ovarienne peut être diminuée, entraînant une infertilité ou un raccourcissement de la fenêtre reproductive, malgré la reprise des règles normales. Par ailleurs, le retour des cycles après chimiothérapie reste un marqueur très insuffisant, qui ne traduit pas les chances de fertilité naturelle ou médicalement assistée.

Cependant, plusieurs facteurs liés à la patiente au moment du diagnostic ou à la stratégie de prise en charge du cancer sont connus pour être corrélés aux chances de grossesse à distance des traitements.

Paramètres dépendant de la patiente

L'âge au moment du diagnostic constitue le facteur de risque principal d'insuffisance ovarienne prématurée et d'infertilité postcancer. Par exemple, la dose de cyclophosphamide nécessaire pour induire une aménorrhée est 4 fois moins importante chez une femme de 40 ans que chez une femme de 30 ans (1). Les paramètres d'évaluation du statut folliculaire ovarien avant le traitement sont également un des marqueurs prédictifs de la réserve ovarienne après le traitement. Dans plusieurs études, il a été montré que les patientes ayant eu une aménorrhée à distance du traitement présentaient des dosages d'AMH sérique initiaux significativement plus bas (2, 3).

Plus récemment, il a été mis en évidence qu'il pourrait exister également des facteurs de sensibilité gonadique à la chimiothérapie propres à chaque patiente. En effet, certains polymorphismes de

gènes impliqués dans la méiose ou dans la folliculogénèse ont été retrouvés associés à l'âge de la ménopause. Ces polymorphismes pourraient également influencer la susceptibilité des gonades à la chimiothérapie (4). À ce jour, aucune recherche génétique n'est effectuée en routine clinique. Si cette hypothèse est confirmée, cela permettra de mieux informer les patientes et de mettre en place une prise en charge optimale en PF avec des techniques de préservation plus lourdes (congélation de cortex) pour les patientes les plus à risques.

Paramètres dépendant du traitement

◆ Les chimiothérapies gonadotoxiques et l'effet dose-dépendant

Le degré de risque d'insuffisance ovarienne après traitement est dépendant du type de chimiothérapie utilisée. Plusieurs classifications ont été proposées en fonction du risque de gonadotoxicité (5). Une toxicité additive des médicaments entre eux existe sans doute également, mais est plus difficile à évaluer (6). La majorité des protocoles de chimiothérapie actuellement proposés dans le cancer du sein comprennent du cyclophosphamide, un agent alkylant au très fort potentiel gonadotoxique, souvent associé à des anthracyclines, des antimétabolites et des taxanes. Ainsi, une patiente atteinte d'un cancer du sein et recevant une chimiothérapie par des agents alkylants après l'âge de 40 ans aura une forte probabilité d'aménorrhée ou d'insuffisance ovarienne après le traitement (7). Par ailleurs, comme décrit ci-dessus, il pourrait exister une sensibilité individuelle à la chimiothérapie. Il est donc particulièrement difficile de déterminer avec précision au niveau individuel l'impact des traitements sur la future fertilité des patientes.

◆ La durée des traitements retardant le projet de grossesse

Chez les patientes préménopausées ayant des tumeurs surexprimant les récepteurs hormonaux positifs, un traitement hormonal adjuvant avec ou sans suppression ovarienne permet une diminution du risque de récurrence. Ce traitement, recommandé pendant 5 à 10 ans après le diagnostic, s'associe à

Summary

Breast cancer is the most frequently occurring cancer in women of reproductive age, the cancer death rate declined due to the advances in therapeutics modality and survivorship goals is pregnancy. Standard therapies used to treat breast cancer can negatively affect reproductive health, resulting in ovarian insufficiency and treatment-associated time delay for pregnancy so making discussions about fertility preservation is essential prior to initiation of gonadotoxic therapies. Early referral to a fertility specialist for interested patients offers patients the most fertility preservation options, with only minimal delay to cancer treatment. The methods used routinely for fertility preservation are oocyte or embryo cryopreservation, or ovarian tissue cryopreservation. However, new approaches are currently under investigation as protecting the ovarian follicular pool during gonadotoxic treatment and show great promise.

Keywords

*Breast cancer
Oncofertility
Fertility preservation
Cryoconservation*

une contre-indication à la grossesse en raison du risque tératogène. Ce type de traitement n'entraîne pas d'atteinte directe de la réserve ovarienne, mais la durée du traitement retarde le projet de grossesse chez une patiente qui est alors soumise à l'altération physiologique de la réserve ovarienne avec l'âge. À l'arrêt de l'hormonothérapie, les patientes, en particulier au-delà de 35 ans, risquent d'être en insuffisance ovarienne complète sans avoir pu aboutir à leur projet de grossesse. La question d'une pause thérapeutique de l'hormonothérapie, pour un projet de grossesse, prend ici toute sa place alors que l'état des connaissances est limité. De même, les biothérapies immunes par l'anticorps monoclonal ciblant le HER2 chez les femmes présentant un HER2+ ne semblent pas induire d'altération de la réserve ovarienne. Cependant, en raison du risque tératogène, il est recommandé de ne pas débiter une grossesse dans les 7 mois suivant la fin du traitement (8).

◆ La radiothérapie

La radiothérapie dans le cancer du sein a un impact très minime sur la réserve ovarienne et la fertilité en comparaison des effets de la chimiothérapie, bien que la dispersion interne des rayonnements mammaires et axillaires puisse avoir des effets indirects sur les ovaires.

Ainsi, actuellement, il n'est pas possible de prédire, pour une patiente donnée, les chances de grossesse à l'issue des traitements. L'objectif est donc d'informer les patientes, de tenter de réduire l'impact des traitements sur la fertilité ultérieure et éventuellement de cryopréserver des gamètes qui ne seront réutilisés qu'en cas d'infertilité post-traitement.

Comment minimiser l'impact des traitements sur la fertilité ultérieure ?

Individualisation du traitement anticancéreux

La 1^{re} stratégie permettant de diminuer l'impact des traitements sur la fertilité ultérieure serait de diminuer l'utilisation des traitements à fort risque gonadotoxique ou leur dose totale délivrée.

En effet, selon la société européenne EUSOMA (European Society of Breast Cancer Specialists), certains protocoles semblent moins pourvoyeurs d'aménorrhée chez les patientes de moins de 40 ans

que d'autres (9). Par exemple, le protocole 6CMF (cyclophosphamide, méthotrexate, 5FU) induit 30 à 80 % de risque d'aménorrhée, alors que ce risque est estimé entre 10 et 25 % pour 6 à 8 FEC/FAC (5-FU, cyclophosphamide, doxorubicine/épirubicine).

De plus, selon le contexte, une chirurgie première pourra parfois être préférée à une chimiothérapie néoadjuvante afin de diminuer les doses de chimiothérapie et de permettre éventuellement des techniques de PF plus optimales.

Bien évidemment, l'objectif de PF en utilisant des traitements moins gonadotoxiques ne doit pas engendrer un risque de récurrence ou de moins bonne efficacité pour la patiente.

Prévention de la gonadotoxicité

Grâce à l'amélioration de la compréhension des mécanismes par lesquels la chimiothérapie affecte les ovaires, de très nombreuses équipes ont cherché à développer des traitements permettant de limiter, in vivo, la déplétion folliculaire (10, 11). À ce jour, ces thérapeutiques sont presque toutes au stade de recherche fondamentale, car seuls les agonistes de la GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*) ont été utilisés, dans cette indication, en pratique clinique chez la femme (12).

◆ Les agonistes de la GnRH

Le blocage ovarien temporaire par les agonistes de la GnRH, dans le but de limiter la gonadotoxicité des chimiothérapies, est toujours considéré comme expérimental. Cette approche est controversée, car son mécanisme d'efficacité n'est pas clairement élucidé. Cependant elle est facilement proposée, car plusieurs études retrouvent un bénéfice et des avantages indéniables, notamment le fait qu'elle ne nécessite aucun délai d'action, n'induit pas d'hyperestradiolémie, ne comprend pas d'intervention chirurgicale supplémentaire, tout en permettant d'assurer une contraception efficace et une aménorrhée durant le traitement par chimiothérapie. Les agonistes de la GnRH sont administrés durant la chimiothérapie par voie sous-cutanée et induisent une inhibition de la sécrétion pulsatile de gonadotrophines hypophysaires entraînant un arrêt de la croissance folliculaire ovarienne et de la sécrétion d'hormones stéroïdiennes. Plusieurs études cliniques ont été réalisées avec des conclusions contradictoires et de nombreux biais rendant l'analyse des résultats difficile. Ainsi, la question d'une utilisation d'agonistes de la GnRH pour toutes les patientes de

moins de 40 ans devant recevoir une chimiothérapie pour cancer du sein fait encore débat (13).

En revanche, il est primordial d'informer les patientes sur l'absence de certitude de ce traitement pour préserver la fertilité et d'associer, si possible, d'autres techniques de PF, comme une préservation ovocytaire ou embryonnaire qui reste la méthode de choix.

Les techniques de préservation de la fertilité : stratégies en cours de développement

Aujourd'hui, de nombreuses molécules ayant pour objectif de limiter la gonadotoxicité des chimiothérapies sont en cours de développement. Le mécanisme permettant d'expliquer le rôle potentiellement protecteur de ces différents agents est plus ou moins clair. La grande majorité des études a été réalisée chez des rongeurs. Si les résultats de ces travaux ont montré, pour la plupart, un rôle protecteur sur la déplétion folliculaire induite par la chimiothérapie, d'autres travaux rapportent des résultats contradictoires. Parmi ces différents traitements proposés, on peut citer en exemple l'utilisation d'AMH recombinante ou de la mélatonine. Plusieurs techniques de PF, ayant pour objectif la cryopréservation des gamètes sont disponibles aujourd'hui. Elles ont largement évolué au cours de ces dernières années pour offrir une prise en charge optimale aux patientes, et de nombreuses études visent encore à les perfectionner (14).

Vitrification ovocytaire ou embryonnaire après stimulation ovarienne

La stimulation ovarienne pour préservation ovocytaire ou embryonnaire est reconnue comme la méthode de référence de PF. Grâce aux avancées récentes, les protocoles de stimulation ovarienne adaptés ont permis une amélioration de leur sécurité dans les cas de tumeurs hormonodépendantes sans augmenter le risque de récurrence et sans induire de délai dans la prise en charge des patientes.

La stimulation ovarienne peut être débutée à n'importe quel moment du cycle menstruel (*random-start protocol*) sans diminuer le rendement ou la qualité ovocytaire, ce qui permet de minimiser le temps nécessaire à la PF avant l'initiation des traitements du cancer. De plus, il est maintenant établi qu'il est possible de réaliser plusieurs cycles de stimulation consécutifs, permettant d'augmenter le nombre

d'ovocytes cryopréservés en peu de temps et donc les chances de grossesse ultérieure (15). Par ailleurs, la stimulation ovarienne entraîne une augmentation des taux d'estrogène circulant. L'administration concomitante d'un antiaromatase (létrozole) permet de minimiser cette augmentation sans nuire à la réponse ovarienne bien qu'aucune preuve n'ait rapportée l'impact négatif de l'hyperestrogénie de la stimulation ovarienne sur le risque de récurrence du cancer ou la survie. Ainsi, de plus en plus d'équipes proposent une stimulation ovarienne avec systématiquement ajout de létrozole, et ce même en cas de chimiothérapie néoadjuvante (16). Cependant, ce traitement antiaromatase n'a pas l'AMM en France dans cette indication.

Le choix de préserver des ovocytes ou des embryons est fait au cas par cas en tenant compte du choix de la patiente sur le plan social, marital ou éthique, mais en l'informant que les embryons appartiennent au couple et qu'ils ne seront pas utilisables par un seul membre du couple (en cas de divorce, décès du conjoint...).

Les chances de grossesses après vitrification ovocytaire dépendent essentiellement du nombre d'ovocytes recueillis et de l'âge de la patiente au recueil. Ainsi, chez les patientes jeunes (< 35 ans), la cryoconservation de 10 à 15 ovocytes matures serait nécessaire pour obtenir presque 70 % de chance d'une naissance vivante (17).

Maturation in vitro

La maturation in vitro (MIV) est considérée comme une méthode expérimentale. Elle s'adresse aux patientes pubères ayant une réserve ovarienne satisfaisante.

Elle ne nécessite pas de stimulation ovarienne et peut donc être proposée sans délai et en cas de lésion hormonodépendante en place. Les ovocytes immatures peuvent être obtenus soit lors d'un prélèvement ex vivo sur la pièce de tissu ovarien au cours de la cryoconservation de cortex ovarien, soit lors d'une ponction par voie transvaginale (8). Ils seront ensuite maturés au laboratoire de biologie de la reproduction, en vue d'une vitrification d'ovocytes matures ou d'embryons.

Du fait du manque de recul et du faible taux de réutilisation, peu de grossesses ont été décrites quand une MIV avec vitrification ovocytaire a été réalisée pour PF dans un contexte oncologique. Ainsi, la MIV doit toujours être proposée, si possible, en association avec une autre technique de PF.

Cryoconservation de tissu ovarien

La cryoconservation de tissu ovarien est encore considérée comme expérimentale bien que de plus en plus de données soient disponibles sur les chances de grossesse après réutilisation. Elle peut être proposée exclusivement ou en complément des techniques de cryoconservation ovocytaire, comme la MIV.

Cette technique présente plusieurs avantages : elle peut être réalisée rapidement, en urgence, à n'importe quel moment du cycle. De plus, c'est la seule technique qui peut être proposée même après le début de la chimiothérapie (18).

Le prélèvement d'un lambeau ovarien, ou d'un ovaire entier en cas de risque très élevé d'insuffisance ovarienne définitive, est réalisé sous coelioscopie. Après le prélèvement, le tissu doit parvenir rapidement au laboratoire de biologie de la reproduction dans des conditions de transport contrôlées et sera cryopréserver par congélation lente. Un fragment est systématiquement envoyé pour examen anatomo-pathologique à la recherche d'une localisation ovarienne de la maladie et une évaluation de la réserve ovarienne par comptage des follicules primordiaux par mm² est effectuée.

La réimplantation des fragments ovariens cryoconservés relève actuellement encore du domaine de la recherche clinique. Une méta-analyse des études de transplantation de tissu ovarien publiée récemment retrouve un taux de grossesse clinique de 57,5 % (19). Une des principales limites de cette technique reste le risque de réintroduction de la maladie en cas de métastase ovarienne, qui, bien que rare en cas du cancer du sein, peut exister. Par ailleurs, en cas de mutation BRCA, la réutilisation de cortex ovarien est problématique.

Aujourd'hui, de nombreuses équipes cherchent à optimiser cette technique. Des protocoles de vitrification du cortex ovarien ou d'ajout de certaines molécules spécifiques dans les milieux de culture, ayant pour objectif de limiter la déplétion folliculaire au moment de la congélation ou de la décongélation du cortex sont en développement mais avec des résultats encore mitigés (20). Par ailleurs, des études expérimentales de folliculogénèse in vitro ou de création d'ovaire artificiel utilisant une matrice extracellulaire dans laquelle sont placés les follicules sont en cours (21).

Conclusion

La décision finale concernant la stratégie de PF à mettre en place est à individualiser en fonction de la patiente et du contexte, elle résulte d'une concertation multidisciplinaire entre les médecins spécialisés en oncofertilité et les oncologues. In fine, le choix sera fait par la patiente, après information éclairée sur la faisabilité des techniques et les avantages et inconvénients de chacune. Par ailleurs, afin d'éviter le plus possible les faux espoirs, il est essentiel d'expliquer à la patiente qu'aucune de ces stratégies ne représente des garanties de grossesse. Il est également primordial de rappeler aux patientes qu'il existe d'autres moyens d'accès à la parentalité, comme le don d'ovocytes ou l'adoption.

Enfin, au cours de ces prochaines années, des études présentant les résultats des différentes stratégies de PF disponibles permettront d'améliorer l'information à délivrer aux patientes et d'optimiser notre prise en charge. De plus, de nouvelles stratégies seront également probablement disponibles. ■

J. Flandrin déclare ne pas avoir de liens d'intérêts.

C. Sonigo et M. Grynberg n'ont pas précisé leurs éventuels liens d'intérêts.

Références bibliographiques

1. Gonçalves V, Quinn GP. Review of fertility preservation issues for young women with breast cancer. *Hum Fertil* 2016;19(3):152-65.
2. Anderson RA et al. Pretreatment anti-Müllerian hormone predicts for loss of ovarian function after chemotherapy for early breast cancer. *Eur J Cancer* 2013;49(16):3404-11.
3. Passildas J et al. Impact of chemotherapy-induced menopause in women of childbearing age with non-metastatic breast cancer - Preliminary results from the MENOCOR study. *Clin Breast Cancer* 2019;19(1):e74-84.
4. Van Dorp W et al. Genetic variation may modify ovarian reserve in female childhood cancer survivors. *Hum Reprod* 2013;28(4):1069-76.
5. Donnez J et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update* 2006;12(5):519-35.
6. Zhao J et al. What lies behind chemotherapy-induced amenorrhea for breast cancer patients: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2014;145(1):113-28.
7. Lambertini M et al. Controversies about fertility and pregnancy issues in young breast cancer patients: current state of the art. *Curr Opin Oncol* 2017;29(4):243-52.
8. Shah NM et al. Young women with breast cancer: fertility preservation options and management of pregnancy-associated breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2019;26(5):1214-24.
9. Cardoso F et al. The European Society of Breast Cancer Specialists recommendations for the management of young women with breast cancer. *Eur J Cancer* 2012;48(18):3355-77.
10. Bedoschi G et al. Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact. *Future Oncol* 2016;12:2333-44.
11. Fisch B, Abir R. Female fertility preservation: past, present and future. *Reproduction* 2018;156(1):F11-27.
12. Roness H et al. Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage. *Fertil Steril* 2016;105:20-9.
13. Lambertini M et al. Ovarian function and fertility preservation in breast cancer: should gonadotropin-releasing hormone agonist be administered to all premenopausal patients receiving chemotherapy? *Clin Med Insights Reprod Health* 2019;13:1179558119828393.
14. Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. *N Engl J Med* 2017;377:1657-65.



Retrouvez l'intégralité des références bibliographiques sur www.edimark.fr

Références bibliographiques (suite p.42)

- 15.** Wald K et al. Back-to-back random-start ovarian stimulation prior to chemotherapy to maximize oocyte yield. *J Assist Reprod Genet* 2019;36(6):1161-8.
- 16.** Letourneau JM et al. Random start ovarian stimulation for fertility preservation appears unlikely to delay initiation of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Hum Reprod* 2017;32(10):2123-9.
- 17.** Cobo A et al. Elective and onco-fertility preservation: factors related to IVF outcomes. *Hum Reprod* 2018;33(12):2222-31.
- 18.** Poirot C et al. Impact of cancer chemotherapy before ovarian cortex cryopreservation on ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod* 2019;34(6):1083-94.
- 19.** Pacheco F, Oktay K. Current success and efficiency of autologous ovarian transplantation: a meta-analysis. *Reprod Sci* 2017;24(8):1111-20.
- 20.** Rios PD et al. Retrievable hydrogels for ovarian follicle transplantation and oocyte collection. *Biotechnol Bioeng* 2018;115(8):2075-86.
- 21.** Akahori T et al. Female fertility preservation through stem cell-based ovarian tissue reconstitution in vitro and ovarian regeneration in vivo. *Clin Med Insights Reprod Health* 2019;13:1179558119848007.