

Manipulations ovariennes en assistance médicale à la procréation : dépasser les standards physiologiques pour de meilleurs résultats cliniques

Ovarian manipulation in ART: going beyond physiological standards to provide best clinical outcomes

Israel Ortega^{1,2}
Juan A. García-Velasco^{1,2,3,4}
Antonio Pellicer^{2,3,4,5}

¹ IVI-Madrid, Madrid, Espagne
<israel.ortega@ivi.es>

² Instituto de Investigación Sanitaria La Fé, Valencia, Espagne
<israel.ortega@ivi.es>

³ Rey Juan Carlos University, Madrid, Espagne

⁴ IdiPAZ, Madrid, Espagne

⁵ IVI-Roma, Rome, Italie

Résumé. Les connaissances récemment acquises sur la physiologie ovarienne ont conduit à remettre en question la conception traditionnelle de la folliculogénèse, et notamment à dissocier les fonctions respectives des organes de l'appareil reproducteur féminin. Elles ont également permis aux médecins de procréation médicalement assistée d'imaginer de nouveaux protocoles de stimulation ovarienne (SO). Le but de cet article est d'évaluer l'efficacité de ces nouvelles approches cliniques, notamment en vue de personnaliser les protocoles et de les adapter aux caractéristiques des patients et aux particularités de chaque situation. Nous avons pour cela réalisé une revue de la littérature disponible sur PubMed, à la recherche des preuves d'efficacité des nouvelles approches de la SO, tant dans les études prospectives que rétrospectives. Nous présentons les principales procédures utilisées, lesquelles agissent sur la croissance folliculaire – avec ou sans la médiation des gonadotrophines –, la modulation de la production d'œstradiol au cours de la SO et le soutien de la phase lutéale, en examinant divers protocoles de stimulation et divers agents de déclenchement.

Mots clés : double stimulation, double déclenchement, préservation de la fertilité, stimulation ovarienne en phase lutéale, mauvaises répondeuses, stimulation ovarienne à départ aléatoire

Abstract. Current knowledge on ovarian physiology has challenged the traditional concept of folliculogenesis, creating the basis for novel ovarian stimulation protocols in assisted reproduction technology. The purpose of this review was to evaluate the efficacy of novel clinical interventions that could aid clinicians in individualizing their protocols to patients' characteristics and personal situations. We conducted a literature review of the available evidence on new approaches for ovarian stimulation from both retrospective and prospective studies in the PubMed database. Here, we present some of the most important interventions, including follicle growth in the gonadotropin-independent and dependent stage, manipulation of estradiol production throughout ovarian stimulation, control of mid-cycle gonadotropin surges, and luteal phase support after different stimulation protocols and trigger agents. The latest research on IVF has moved physicians away from the classical physiology, allowing the development of new strategies to decouple organ functions from the female reproductive system and challenging the traditional concept of IVF.

Key words: double stimulation, dual triggering, fertility preservation, luteal phase ovarian stimulation, poor responders, random-start ovarian stimulation

La représentation des maladies et des traitements qu'entretient la médecine moderne se fonde sur un modèle simpliste, selon lequel la défaillance d'un organe doit être palliée par une intervention médicale ou chirurgicale procédant des connaissances physiologiques disponibles. Ainsi, un fonctionnement anormal des organes de la reproduction conduit la médecine à proposer aux couples infertiles une

fécondation *in vitro* (FIV), pour obtenir une grossesse. Tous les protocoles de stimulation ovarienne (SO), depuis la naissance du premier « bébé-éprouvette » se fondent sur l'utilisation de gonadotrophines exogènes pour induire, durant la phase folliculaire, la croissance de plusieurs follicules, permettant ainsi la fertilisation de plusieurs ovocytes matures par un échantillon de sperme.

Médecine
de la **Reproduction**

Tirés à part : I. Ortega

Néanmoins, les dernières recherches menées en FIV ont conduit les médecins à s'éloigner des concepts physiologiques classiques pour inventer de nouvelles stratégies dissociant la fonction des différents organes de l'appareil reproducteur féminin, en vue d'obtenir de meilleurs résultats cliniques. La stratégie du *freeze-all* est l'une des principales avancées de la médecine de la reproduction, en ce qu'elle permet le transfert d'embryons au cours de cycles successifs, au lieu du seul transfert d'un embryon frais. La vitrification des ovocytes et des embryons offre d'excellents résultats, notamment par comparaison avec la congélation lente, que ce soit en termes de taux de survie (jusqu'à 97 % chez une femme jeune) [1, 2] ou de taux d'implantations et de grossesses, qui ne diffèrent pas de ceux observés avec un ovocyte frais [3]. La mise au point de la technique de vitrification a radicalement modifié la pratique clinique dans les centres d'assistance médicale à la reproduction (AMP), et montré que, contrairement à ce qui était admis jusque-là, la fonction ovarienne n'est pas nécessairement couplée à celle de l'utérus, et qu'une dissociation des deux est possible dans la cadre des protocoles d'AMP.

Une telle disjonction entre ovaire et utérus peut être obtenue de différentes façons. Le don d'ovocytes, par exemple, permet d'obtenir une grossesse, après préparation de l'utérus de la receveuse par des hormones exogènes. L'ovaire peut encore être stimulé par une supplémentation en progestérone, permettant ainsi de réaliser une SO en dehors de la phase folliculaire. Une étude publiée en 1987 rapportait déjà un développement folliculaire multiple, obtenu dans ces conditions, conduisant à une grossesse viable [4], invalidant ainsi l'idée auparavant admise que seule la période folliculaire peut donner lieu au développement d'une cohorte de follicules [5, 6]. Des études plus récentes, menées chez des patientes mauvaises répondeuses et atteintes de cancer, ont en outre montré qu'une SO peut être réalisée durant la phase lutéale, avec des résultats optimaux.

L'ensemble de ces résultats montre qu'il a été possible de déterminer plusieurs procédés de modulation de la fonction ovarienne s'éloignant du modèle classique, et que ces nouvelles approches ont permis une prise en charge optimale pour toutes les patientes. Cette amélioration passe en effet en particulier par une personnalisation des traitements, et ce dans une gamme étendue de situations, telles que la préservation de la fertilité chez des femmes mauvaises répondeuses ou touchées par le cancer, ainsi qu'une adaptation des protocoles au mode de vie de la patiente. Le présent article fait la synthèse des avancées effectuées au cours des dix dernières années dans la connaissance de la physiologie ovarienne, dans le cadre de l'AMP. Nous décrivons notamment de quelle façon il est désormais possible d'intervenir sur chaque étape de la SO (*figure 1*), et l'application de ces techniques à la FIV, chez des patientes ménopausées ou touchées par

le cancer et engageant une procédure de préservation de la fertilité.

Méthodes

Nous avons synthétisé les résultats de plusieurs études, afin de clarifier les différents aspects de la manipulation ovarienne et de leurs applications cliniques. Nous avons ainsi retenu les études rétrospectives, prospectives et cas témoin recensées par PubMed, en utilisant les mots clés suivants, seuls ou associés : analogues de la gonadolibérine (GnRH), citrate de clomifène, activation *in vitro*, stimulation modérée, kisspeptine, létrozole, SO en phase lutéale, préservation de la fertilité, SO à départ aléatoire, double stimulation, cryopréservation des ovocytes/embryons, tamoxifène¹. Une seconde sélection a ensuite été appliquée aux articles ainsi recueillis, fondée sur la pertinence du sujet de l'étude, l'intérêt de ses résultats et leur application clinique possible. Seuls les articles en anglais étaient en outre retenus. Des recherches analogues ont ensuite été menées dans la base ClinicalTrials.gov, qui recense les essais cliniques en cours, ainsi que dans les directives et les protocoles institutionnels.

Physiologie ovarienne

La médecine de la reproduction s'est fondée, durant plusieurs dizaines d'années, sur les études menées chez le primate, puis sur les données issues du développement de l'AMP dans les années 1980. Ce corpus a notamment permis de mieux comprendre les mécanismes qui soutiennent la croissance et l'atréxie folliculaire, les fonctions du corps jaune et la maturation de l'ovule. Un article historique, publié en 1982, a ainsi décrit le recrutement et la sélection du follicule dominant, le milieu intrafolliculaire et la régulation de la fonction hypophysaire par l'ovaire, posant les bases et les standards de la recherche des années qui suivront, dans le domaine de la physiologie ovarienne [7]. L'ovaire des primates se caractérise par le développement d'une cohorte de follicules, dont un seul atteindra le stade préovulatoire, conduisant à une ovulation unique, chaque mois [8] – la plupart des follicules étant ainsi voués à l'atréxie. Chez l'humain, les follicules primordiaux subissent un premier recrutement, constituant ainsi un pool de follicules primaires, qui atteignent le stade de follicule secondaire 120 jours plus tard, puis, après encore quatre-vingt-cinq jours, celui de follicule antral. Selon les données classiquement admises, la croissance folliculaire, depuis

¹ GnRH analogues, clomiphene citrate, in vitro activation, mild stimulation, kisspeptin, letrozole, luteal phase OS, fertility preservation, random-start OS, double stimulation, oocyte and embryo cryopreservation, tamoxifen.

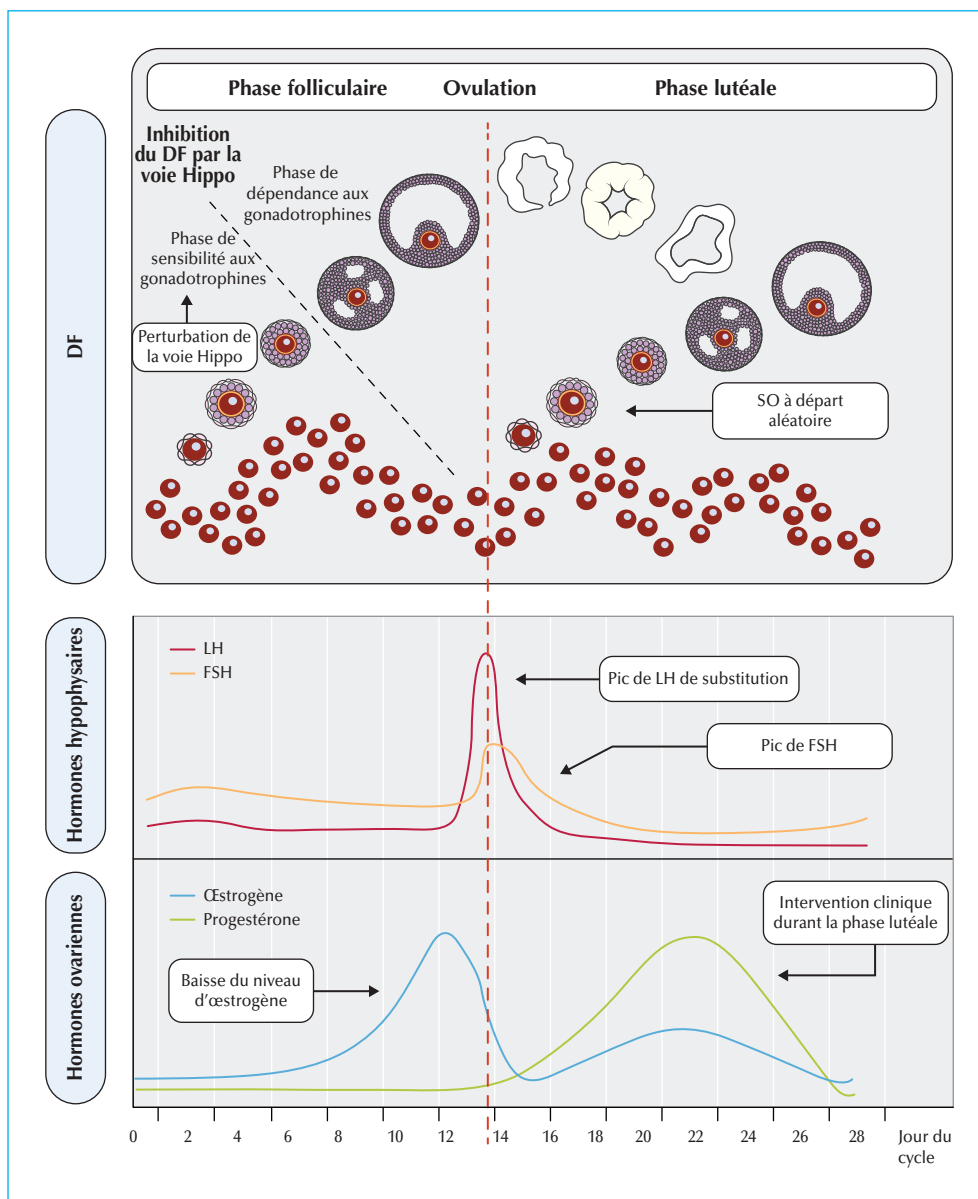


Figure 1. Diagramme représentant les divers événements survenant durant le cycle menstruel, et les différentes possibilités d'y intervenir cliniquement. De haut en bas : émergence et régression des vagues de follicules chez une femme présentant deux de ces vagues, fluctuations des hormones ovariennes et pituitaires. (Adapté de De Mello Bianchi *et al.* [96].) DF : développement folliculaire, SO : stimulation ovarienne.

le stade préantral jusqu'à l'élection du follicule dominant, est indépendante des hormones gonadotropes, du fait de la faible activité proliférative des cellules de la granulosa, d'une faible expression des enzymes de la stéroïdogenèse et d'une *down-regulation* des récepteurs de l'hormone folliculostimulante (FSH). Une fois qu'ils ont atteint une taille de 2 mm, les follicules passent sous dépendance de la FSH. Sous l'effet de cette dernière, dont les taux circulants augmentent alors, et de plusieurs facteurs intrafolliculaires, une cohorte de follicules préantraux (2-5 mm de diamètre) échappe à l'apoptose

[9]. Deux phases peuvent donc être distinguées dans le développement folliculaire :

- la première, marquée par une simple sensibilité aux gonadotrophines (stade préantral),
- la seconde, caractérisée par une dépendance aux gonadotrophines (stade antral et au-delà).

En effet, si les follicules, dans les étapes précédant le stade antral, ne sont pas sous la dépendance de la FSH, ils y sont néanmoins sensibles. Ils sont alors en outre soumis à la régulation de facteurs intra-ovariens (e.g., facteur

natriurétique C [CNP]) et de voies de signalisation (e.g., AKT et mTOR [pour *mechanistic target of rapamycin*]), qui constituent autant de cibles possibles pour développer de nouvelles approches thérapeutiques [10].

Les nouveaux protocoles de SO nous ont conduits à reconsidérer nos acquis sur la physiologie ovarienne, et par là même toute la prise en charge, notamment endocrinologique, de l'infertilité. Nous décrivons, dans cet article, les principales modalités modernes d'intervention sur la folliculogénèse, en particulier celles visant la croissance folliculaire dans la phase d'indépendance aux gonadotrophines, les protocoles de SO à départ aléatoire, les manipulations sur la production d'œstradiol, le contrôle du pic de gonadotrophines de milieu de cycle et la sécrétion de progestérone.

Interventions sur le follicule durant la phase d'indépendance aux gonadotrophines

La voie de signalisation Hippo chez la patiente en insuffisance ovarienne primaire

La mise au point de techniques permettant de faire croître des follicules primordiaux jusqu'au stade préantral a invalidé la notion, qui prévalait jusqu'ici, que le développement des follicules ne peut pas être activé tant qu'ils ne sont pas passés sous la dépendance aux gonadotrophines.

Hippo est une voie de signalisation impliquée dans le contrôle de la taille de l'individu et dans l'homéostasie des organes. Elle consiste en une série de kinases à effet inhibiteur, qui phosphorylent et inactivent des effecteurs Hippo, lesquels jouent des rôles déterminants dans la restriction de la prolifération cellulaire et l'activation de l'apoptose. Il a été démontré que plusieurs agents de la voie Hippo, tels que YAP (pour *Yes-associated protein*) et TAZ (pour *transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*), exercent un effet inhibiteur sur le développement des follicules aux stades préantral et antral (*figure 1*). Ainsi une perturbation de la voie Hippo entraîne-t-elle, en aval, une stimulation des protéines CCN, facteurs de croissance et inhibiteurs de l'apoptose, entraînant une prolifération et une croissance cellulaires. La voie Hippo est ce qui, chez les mammifères, restreint physiologiquement la croissance folliculaire.

Il a été montré, sur modèle murin, que la technique de fragmentation ovarienne induisait une perturbation de la voie Hippo et une activation de la polymérisation de l'actine, entraînant une stimulation de la croissance folliculaire et la genèse d'ovocytes matures [11].

Des études préalables, menées sur des souris *knock-out* pour le gène *PTEN* (pour *phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10*) avaient montré que la voie AKT joue un rôle de premier plan dans l'activation et le

développement des follicules primordiaux dormants [12]. Ainsi le traitement de fragments ovariens contenant des follicules secondaires avec des stimulateurs de la voie Akt induit-il une activation de la croissance folliculaire. La même équipe a combiné ces deux techniques pour mettre au point une méthode d'activation *in vitro* (AIV) qui pourrait être appliquée aux femmes touchées par l'insuffisance ovarienne primaire (IOP), en induisant la croissance de follicules résiduels et en augmentant le nombre d'ovocytes matures à l'issue d'un protocole de FIV.

Kawamura *et al.* [11] ont rapporté la première naissance à la suite d'une vitrification ovarienne avec AIV et greffe, en vue de stimuler la croissance folliculaire avant autogreffe. Les ovaires de trente-sept patientes infertiles ont été ôtés par chirurgie laparoscopique, dilacérés et vitrifiés. Après analyse histologique, les lambeaux ovariens ont été décongelés, fragmentés en une centaine de cubes de 1 à 2 mm² et traités par des stimulateurs de la voie AKT durant deux jours. Les tissus ovariens qui en résultaient ont été greffés chez les patientes, sous la séreuse des trompes de Fallope, et la croissance des follicules a été monitorée durant le protocole de FIV [11]. Chez vingt des trente-sept patientes, les ovaires contenaient des follicules résiduels, et, chez neuf d'entre elles, une croissance folliculaire était observable dans les fragments greffés. Vingt-quatre ovocytes ont ainsi pu être recueillis chez six patientes. Quatre patientes ont ensuite bénéficié d'une FIV et d'un transfert d'embryon, menant à une fausse couche et à deux accouchements [13]. À ces deux naissances vivantes, qui se sont produites à l'hôpital de l'université Sainte-Mariana [11, 13], s'en sont ajoutées deux autres, issues d'AIV, en Chine et en Espagne [14]. Il est intéressant de noter que l'histologie des cortex ovariens et la durée entre le diagnostic d'IOP et l'ovariectomie sont les deux principaux facteurs pronostiques du résultat de l'AIV [15].

Cette procédure repose sur l'activation systématique des follicules résiduels, conduisant à la croissance folliculaire et à la production d'ovocytes matures. Au-delà des femmes en IOP, elle pourrait être appropriée dans le cadre de la préservation de fertilité chez des femmes atteintes de cancer et recevant des traitements stérilisants, et chez des femmes en préménopause ayant une diminution de la réserve ovarienne. Si elle permet d'obtenir des ovocytes matures chez des femmes d'âge avancé, cette approche ne permet pas de pallier les défauts ovocytaires liés à l'âge.

Interventions durant la phase dépendante des gonadotrophines

Stimulation à départ aléatoire et patientes cancéreuses

Dans les cycles de procréation assistée, les gonadotrophines sont administrées dès la phase folliculaire

précoce, afin d'étendre la fenêtre de recrutement et de permettre ainsi au plus grand nombre possible de follicules d'échapper à l'atréisie. Des protocoles innovants ont été développés, au cours des dernières années, qui proposent de démarrer la SO à d'autres stades du cycle. Le développement de ces variantes a dans un premier temps été contrecarré par le dogme selon lequel un développement simultané ne peut être obtenu qu'en appliquant la SO précocement, en vertu de la théorie d'une vague unique de développement folliculaire, et la croyance en un effet inhibiteur local exercé par le corps jaune et par la progestérone, durant la phase lutéale. Cette théorie de la vague unique a originellement été importée de la médecine vétérinaire, où des dynamiques de cette sorte sont décrites dans les ovaires de plusieurs animaux domestiques [16, 17]. Deux schémas de vague folliculaire sont décrits :

- l'un, dit majeur, dans lequel un follicule dominant se détache du groupe en quelques jours, et poursuit son développement jusqu'à l'ovulation, cependant que les autres follicules subissent l'atréisie,
- un second, mineur, dans lequel aucune dominance ne se déclare, et où l'ensemble des follicules tombent en atréisie.

Chez la femme, la date du recrutement et celle de la vague folliculaire sont déterminées, en cycle naturel, par le nombre de vagues qui se produisent durant le cycle : 68 % des femmes présentent deux vagues de développement folliculaire dans l'intervalle interovulatoire, et 32 % en ont trois. Dans l'un et l'autre cas, c'est la dernière vague, survenant dans la phase folliculaire précoce du cycle, qui est ovulatoire – les vagues précédentes, situées dans la phase lutéale, ne l'étant pas [18]. Cette théorie des vagues remet en cause le concept classique de la folliculogénèse, et fonde les protocoles de SO durant la phase lutéale.

La vitrification ovocytaire est le procédé de choix en matière de préservation de la fertilité, que le contexte soit oncologique ou non, du fait des excellents taux de survie et des résultats cliniques optimaux observés après décongélation (Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology [19]). Chez les patientes atteintes de cancer, la SO par antagoniste de la GnRH est le traitement de référence. Madrigano *et al.* [20] rapportent que la durée moyenne entre la première évaluation et le recueil des ovocytes, chez un groupe de patientes atteintes de cancer ayant bénéficié d'une SO, avant chimiothérapie, est de 33,3 jours. Cette valeur est importante, dans cette population chez qui la « fenêtre » pour le recueil des ovocytes peut être étroite, le temps étant compté avant l'initiation de la chimio- ou de la radiothérapie, ne laissant parfois pas même le temps de procéder à une SO. Pour remédier à cette contrainte, une nouvelle stratégie est développée depuis quelques années, dans laquelle la SO

est engagée à n'importe quelle étape du cycle. Il existe cependant peu de données, dans la littérature, concernant cette SO à départ aléatoire et la préservation de fertilité d'« urgence ». Von Wolff *et al.* [6] ont, les premiers, initié une SO (par antagoniste de la GnRH et FSH recombinante) durant la phase lutéale chez des patientes atteintes de cancer, et les ont comparées avec des femmes stimulées durant la phase folliculaire. Aucune différence significative des dosages de gonadotrophines ni des durées d'administration n'était relevée entre les deux groupes. Le nombre d'ovocytes recueillis était légèrement supérieur dans le groupe stimulé en phase folliculaire (13,1 *versus* 10,0), mais pas de façon significative. Les taux de maturation (83,7 *versus* 80,4 %) et de fécondation (61,0 *versus* 75,6 %) étaient également comparables dans les deux groupes. Ces données ont ensuite été confirmées par des études et des séries de cas sur de plus faibles effectifs [21, 22]. Von Wolff *et al.* [23] ont récemment publié la plus grande étude, à ce jour, sur la SO à départ aléatoire : elle incluait 684 femmes ayant bénéficié d'une SO préalablement à un traitement gonadotoxique. Les patientes étaient séparées en trois groupes, selon le jour de début de la stimulation :

- groupe A : phase proliférative précoce (jours 1 à 5 du cycle),
- groupe B : phase proliférative tardive (jours 6 à 14 du cycle),
- groupe C : phase lutéale (après le quatorzième jour).

Les doses totales de gonadotrophines dispensées étaient significativement plus importantes dans le groupe C que dans les deux autres, du fait d'une durée de stimulation légèrement plus grande dans ce groupe. Le nombre d'ovocytes recueillis était significativement plus important dans les groupes B et C que dans le A. Ces résultats confirment ceux d'études de plus petite envergure, et suggèrent que des protocoles de stimulation peuvent être engagés à n'importe quel stade du cycle, y compris la phase lutéale, avant un traitement gonadotoxique [23].

Double stimulation chez les mauvaises répondeuses

Malgré la gamme étendue de protocoles et de thérapies adjuvantes désormais proposée aux patientes mauvaises répondeuses, ces femmes présentent toujours des résultats décevants en matière de procréation. Aussi ces situations constituent-elles un enjeu à part entière pour la médecine de la reproduction. Le recrutement des follicules en phase lutéofolliculaire, chez les mauvaises répondeuses, a initialement été proposé par Rombauts *et al.* [5], qui ont tenté d'augmenter le nombre d'ovocytes recueillis après SO en engageant la stimulation dans la phase lutéale du cycle précédent, chez des patientes ayant eu un cycle de stimulation suboptimal. Quarante patientes dont le cycle

avait été inhibé par un agoniste de la GnRH (GnRHa) ont été randomisées pour recevoir 150 UI de FSH, soit au troisième jour du cycle (groupe contrôle), soit au vingt-cinquième jour du cycle précédent (groupe expérimental). Il n'y avait pas de différence significative du nombre d'ovocytes recueillis dans l'un et l'autre groupe, et les auteurs concluent que l'administration prolongée de gonadotrophines exogènes, engagée dès la phase lutéale, ne permet pas à un plus grand nombre de follicules d'échapper à l'atréxie. À la lumière de ces résultats, certains auteurs ont suggéré qu'une SO continue, avec deux recueils d'ovocytes dans le même cycle, l'un à la phase folliculaire, l'autre à la phase lutéale, pourrait présenter un intérêt chez les femmes mauvaises répondeuses, lorsque aucun ovocyte n'est obtenu après SO à la phase folliculaire [24]. Kuang *et al.* ont ainsi conduit une étude évaluant l'efficacité de la double stimulation, en phases lutéale et folliculaire, chez des patientes soumises à une FIV avec SO modérée. Durant la première phase du protocole, les patientes recevaient létrozole, citrate de clomifène et 150 UI de gonadotrophine humaine ménopausique (hMG), pour stimuler le recrutement folliculaire. La seconde phase était engagée soit le même jour, soit le lendemain du premier recueil d'ovocytes, et consistait en l'administration de létrozole et de doses plus fortes de gonadotrophines (225 UI d'hMG). Aucune différence significative n'était observée entre les deux recueils d'ovocytes, que ce soit en termes d'ovocytes matures, de fécondation, de taux de clivage, de nombre d'embryons top-qualité ou d'embryons congelés [25]. Une étude ultérieure, intéressante, a rapporté un nombre comparable de blastocystes euploïdes par ovocyte MII injecté après stimulation en phases folliculaire et lutéale du même cycle menstruel, chez des patientes mauvaises répondeuses [26]. La double stimulation peut donc contribuer à augmenter, chez ces patientes, le nombre de blastocystes transférables, et par là même la probabilité d'obtenir des embryons euploïdes transférables, et donc le résultat du protocole reproductif.

Modulations des sécrétions d'œstradiol en phase folliculaire

Syndrome d'hyperstimulation ovarienne chez les patientes atteintes de cancer

Durant le cycle physiologique, le développement d'un follicule dominant durant la phase folliculaire est associé à une augmentation de la production d'œstradiol, conséquence de l'activité aromatasase dans les cellules de la granulosa [27]. De la même façon, dans le cadre d'une FIV, les niveaux sériques en œstradiol sont d'autant plus élevés que les follicules en croissance sont nombreux, ces taux étant également fonction des patientes et des doses de gonadotrophines employées. L'usage concomitant

d'hormone lutéinisante (LH) accroît encore la production d'œstradiol, en stimulant de façon dose-dépendante la synthèse d'androgènes, lesquels sont ensuite convertis en œstrogènes par l'aromatase [28].

La congélation d'ovocytes pour éviter les effets indésirables des œstradiolémies élevées sur le syndrome d'hyperstimulation ovarienne et l'implantation-placentation

L'impact d'un niveau élevé d'œstradiol, le jour du déclenchement de l'ovulation, sur l'issue du protocole, est débattu depuis longtemps. Quelques auteurs ont ainsi pu montrer que des niveaux élevés n'affectaient pas le résultat d'une FIV [29, 30], quand d'autres ont au contraire observé qu'ils compromettaient la réceptivité endométriale, et donc le résultat du processus [31]. Il a en outre été montré que les œstrogènes modulent la synthèse du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A (VEGF-A), via un récepteur œstrogénique α (ER α), lequel pourrait être impliqué dans le syndrome d'hyperstimulation ovarienne (SHO) et dans la physiopathologie du cancer du sein [32].

Préservation de la fertilité avec suppression de l'activité aromatasase

Outre les possibles effets délétères de niveaux supraphysiologiques d'œstradiol sur les résultats reproductifs, une modulation de sa production doit être envisagée chez les patientes touchées par des tumeurs malignes hormonodépendantes, telles que des cancers de l'endomètre ou du sein ER⁺. Dans ces circonstances, il convient d'administrer 2,5 à 5 mg/j de létrozole (selon l'état de la réserve ovarienne de la patiente) lors de la SO, afin de maintenir les niveaux d'œstradiol à des niveaux physiologiques jusqu'au déclenchement [33]. Plusieurs études cliniques menées chez des patientes atteintes de cancers hormonodépendants ont montré que l'administration de létrozole réduisait significativement les niveaux d'œstradiol mesurés dans le sérum, que le cycle soit normal ou à départ aléatoire [34]. En soustrayant l'axe hypothalamohypophysaire du rétrocontrôle œstrogénique négatif et en inhibant la conversion par l'aromatase des androgènes en œstrogènes, le létrozole induit une augmentation des concentrations intrafolliculaires en androstènedione et en testostérone, et par là de la croissance du follicule [35]. Le létrozole ne présente en outre aucun inconvénient en termes de résultats reproductifs – nombre d'ovocytes total et d'ovocytes matures –, aussi bien en protocole traditionnel qu'à départ aléatoire [34, 36]. Il faut noter que l'usage de létrozole dans la SO n'affecte pas le taux de survie sans rechute, après une médiane de suivi de deux ans [37]. Sur la base de ces observations, l'adjonction de létrozole aux gonadotrophines, lors de la SO, apparaît comme une modalité sûre et

efficace de prise en charge des patientes porteuses de cancer, au moins à court terme. D'autres agents ont également été expérimentés dans le cadre de la préservation de fertilité chez des patientes atteintes de cancer du sein. Ainsi, le citrate de tamoxifène, un modulateur sélectif des ER, entre en compétition avec l'œstrogène pour la fixation sur ces récepteurs dans des organes cibles, tels que le sein. Le tamoxifène est utilisé depuis plus de trente ans, avec de bons résultats, pour réduire les rechutes de cancer du sein et améliorer la survie de patientes jeunes et préménopausées [38], exposées à des taux élevés d'œstrogènes durant le traitement [39]. Plusieurs arguments militent pour une utilisation du tamoxifène, plutôt que du létrozole. Le premier, contrairement au second, est utilisé dans le traitement de l'infertilité depuis longtemps, et son utilisation en clinique ne demande pas d'autorisation particulière. Une étude récente a en outre démontré que l'administration de tamoxifène durant la stimulation était une modalité sûre et efficace de préservation de la fertilité, malgré des taux élevés d'œstrogène [40]. Il n'existe en revanche pas de donnée en faveur l'utilisation de tamoxifène pour une stimulation en phase lutéale.

Contrôler le pic de gonadotrophine de milieu de cycle

L'une des principales causes d'échec des protocoles de FIV est la survenue d'un pic prématuré de LH (PPLH). Les protocoles conventionnels doivent donc, notamment, empêcher cette inhibition de l'ovulation [41]. L'effort se portait principalement, dans les premiers temps de la PMA, sur une détection de l'augmentation préovulatoire de LH, chez les femmes subissant une SO par gonadotrophine, par mesure des taux urinaires ou sériques de l'hormone [42]. Pour autant, 30 % des femmes connaissaient un PPLH, malgré cette surveillance, et une annulation consécutive du cycle [43].

L'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG), dont les caractéristiques structurales et biologiques sont très proches de celles de la LH, a toujours constitué le traitement de choix pour induire les dernières étapes de la maturation ovocytaire. Si les deux molécules activent les récepteurs LH/hCG, leurs demi-vies sont très différentes : 60 min pour la LH, contre 24 h pour la hCG [44, 45]. Une telle différence a d'importantes conséquences ; la hCG exerce naturellement une activité lutéotrope plus soutenue, mais elle donne également lieu à des effets indésirables, associés à la production de molécules vasoactives, telles que le VEGF. Ce dernier joue du reste un rôle de premier plan dans la survenue du SHO, qui est la plus redoutable complication des protocoles de PMA [32]. Plusieurs stratégies de FIV ont ainsi été mises au point, au cours des dernières années, en vue d'éviter le PPLH et de prévenir le risque de SHO.

Prévention du pic précoce d'hormone lutéinisante

Analogues de la gonadolibérine

L'utilisation d'agonistes de la GnRH a été introduite dans les protocoles de FIV dans les années 1980. Ces molécules, administrées à la phase folliculaire (protocole court) ou à la phase lutéale du cycle précédent (protocole long), se sont montrées efficaces pour empêcher la survenue du PPLH, et leur emploi en pratique clinique s'est ainsi largement répandu jusqu'à aujourd'hui [46, 47]. L'ajout d'un GnRHa aux gonadotrophines présente en outre des avantages importants, notamment une amplification du recrutement folliculaire, permettant le recueil d'un plus grand nombre d'ovocytes, et des améliorations du schéma de traitement proposé aux patientes [20, 48]. À l'inverse, les GnRHa dans les protocoles longs sont associés à plusieurs problèmes, notamment la nécessité d'un traitement long pour obtenir la désensibilisation, un risque accru de SHO et une plus grande fréquence des effets secondaires dus à l'hypo-œstrogénémie [49].

Dans ce contexte, l'introduction des antagonistes de la GnRH dans les protocoles de PMA, en vue de prévenir le PPLH, semble permettre de remédier aux inconvénients des agonistes, et de proposer ainsi une FIV moins inconfortable [50]. L'inhibition immédiate et profonde de l'axe hypothalamohypophysaire, en vue d'empêcher le PPLH, a permis de réduire la durée de stimulation ainsi que les doses de gonadotrophines employées, et ainsi de limiter les effets indésirables dus à l'hypo-œstrogénémie [51]. Ces caractéristiques, qui étaient associées à une incidence moindre de SHO et à de meilleurs résultats de la FIV, ont largement amélioré la perception des protocoles par les patientes, par comparaison avec le recours aux analogues de la GnRH, et cette procédure est désormais utilisée en première intention par la plupart des équipes de PMA [49, 52].

Citrate de clomifène

Le citrate de clomifène (CC) est un agent antiœstrogénique approuvé pour le traitement des dysfonctionnements ovariens. La molécule agit sur l'hypothalamus, où elle amplifie la sécrétion de FSH et la fréquence de libération de LH, conduisant à une stimulation ovarienne d'amplitude modérée puis à l'ovulation [53]. Les schémas thérapeutiques courants comprennent des doses de CC de 50 à 250 mg/j, administrées dès les premiers temps de la phase folliculaire et durant cinq jours, l'interruption conduisant à l'ovulation [54]. Toutefois, l'administration continue de CC durant la SO, dans les protocoles de stimulation modérée, a des effets inverses. Kato *et al.* [55] ont ainsi développé un protocole innovant, dans lequel le CC (50 à 100 mg/j) est administré à compter du troisième jour du cycle jusqu'à la veille de la prise de GnRH, qui déclenche la maturation ovocytaire. Un PPLH n'était alors observé que dans 3,5 % des cas [55]. Un effet comparable

a été observé chez des donneuses ayant un compte de follicules antraux normal, chez qui une stimulation longue a été réalisée avec le CC : le PPLH était empêché par l'effet antiœstrogénique exercé par le CC sur l'hypophyse, en dépit des niveaux élevés d'œstrogène [56]. L'administration continue de CC apparaît ainsi comme une méthode efficace d'inhibition de la fonction hypophysaire, et offre une troisième possibilité, après les agonistes et antagonistes de la GnRH, pour prévenir la survenue d'un PPLH.

Progestatifs

Un nombre croissant de données suggèrent que l'usage des progestatifs pourrait constituer une méthode valide de prévention du PPLH au cours de la SO. La suppression de la LH induite par les progestatifs a été largement mise à profit, par le passé, dans les recherches sur les pilules contraceptives [57, 58]. Plus particulièrement, l'acétate de médroxyprogestérone (MPA) exerce un effet progestatif modéré à fort, et n'altère pas le résultat des mesures de progestérone endogène [59]. Il a été montré que l'administration de 10 mg/j de MPA et d'hMG (150-225 UI/j), à partir du troisième jour du cycle, est une méthode efficace pour prévenir le PPLH chez des patientes recevant une SO dans le cadre d'une FIV, sans affecter les résultats, en termes de grossesses [60]. Les protocoles recourant au MPA sont en outre associés à un risque moindre de SHO, tant dans les phases folliculaire que lutéale, et ce malgré l'emploi de quantités plus fortes de gonadotrophines, rendues nécessaires par l'atténuation de la sensibilité folliculaire à ces hormones, par les taux élevés de progestérone [35, 60, 61]. Des études plus récentes ont montré que la survenue du PPLH pouvait également être prévenue par d'autres progestatifs, chez des femmes présentant une ovulation normale, lors de la SO dans le cadre d'une FIV avec congélation d'embryon, avec des résultats optimaux en matière de reproduction [62, 63].

Déclencher la maturation ovocytaire pour améliorer sa qualité

Double déclenchement

L'idée a émergé, au cours des dernières années, que l'association d'une dose unique de GnRHa et d'une dose standard ou réduite de hCG pourrait améliorer les résultats de FIV, en termes de taux de maturation folliculaire. Fabris *et al.* [64] ont ainsi montré qu'un double déclenchement permettait, pour des patientes chez qui un précédent cycle de FIV avec hCG seule avait conduit à plus de 50 % d'ovocytes immatures, d'obtenir un plus grand nombre d'ovocytes matures et de meilleurs résultats reproductifs [64]. Le double déclenchement a également été comparé à un GnRHa employé seul : il entraîne un plus grand nombre de naissances vivantes (52,9 *versus* 30,9 %) chez les patientes présentant une forte réponse à la stimulation,

sans augmenter le risque de HSO [65]. Chez les femmes ayant une réponse normale, la double stimulation obtient également de meilleurs résultats de FIV que l'association d'une dose standard de hCG et d'un antagoniste de la GnRH [66]. Le double déclenchement a enfin été également expérimenté chez des mauvaises répondeuses, conduisant à de meilleurs taux de recueil d'ovocytes que le GnRHa seul [67, 68]. Ce procédé pourrait en outre être opportun en cas de syndrome du follicule vide ou lorsque de nombreux ovocytes immatures sont recueillis après déclenchement [67].

Pic d'hormone folliculostimulante

Dans la plupart des espèces de mammifères, l'ovulation naturelle est précédée d'un pic de LH et de FSH, résultantes d'un accroissement de la sécrétion de GnRH et d'une accumulation de ses récepteurs dans l'hypophyse. Le pic de FSH, en particulier, joue un rôle important dans la maturation de l'ovocyte, comme il a été observé *in vitro*, et dans l'ovulation [69, 70]. Les protocoles classiques de FIV reposent sur l'administration de hCG, en vue d'induire un pic de LH, 36 h plus tard, et la fin de la maturation ovocytaire. Les niveaux de FSH peuvent néanmoins être diminués à cette étape, du fait de la *down-regulation* de l'hypophyse au cours des protocoles de stimulation, la dernière dose de gonadotrophine pouvant être administrée jusqu'à deux jours avant le recueil d'ovocytes.

Dans ce contexte, Lamb *et al.* [71] ont mené une étude en vue d'évaluer si l'administration d'un bolus supplémentaire de FSH, au moment du déclenchement par hCG, améliorerait la compétence des ovocytes au développement. Si les taux de fécondation observés chez les patientes recevant ce traitement étaient supérieurs à ce qu'ils étaient dans le groupe contrôle, aucune différence n'était constatée entre les deux bras en termes de grossesses et de naissances vivantes. Ainsi, malgré de premiers résultats encourageants, de nouvelles études sont nécessaires pour évaluer les bénéfices cliniques qu'il est raisonnable d'attendre de cette approche en FIV [71].

Déclencher la maturation ovocytaire pour éviter le syndrome d'hyperstimulation ovarienne

Agonistes de la gonadolibérine

Suite à l'introduction des antagonistes de la GnRH dans les protocoles de SO, au cours des années 1990, il a été proposé d'administrer, en remplacement de la hCG, un seul bolus de GnRHa pour induire le pic de LH, les dernières étapes de la maturation ovocytaire et l'ovulation [72]. Les GnRHa ont l'avantage d'exercer une action rapide et réversible, et d'induire un pic de LH plus court que la hCG, associé à un risque moindre de SHO [73]. Ces GnRHa induisent en outre un pic de FSH, lequel peut, en synergie avec la LH, favoriser la maturation nucléaire de

l'ovocyte et l'expansion du cumulus [74]. L'utilisation des GnRHa pour déclencher l'ovulation présente néanmoins un inconvénient majeur, qui est d'induire une phase lutéale de durée insuffisante, malgré les suppléments en œstradiol et en progestérone, conduisant à un moindre taux de naissances [75]. Plusieurs protocoles ont été envisagés, au cours des dernières années, pour tenter de remédier à l'insuffisance de la phase lutéale associée à l'usage de GnRHa.

Kisspeptines

Les kisspeptines (KP) sont un ensemble d'hormones peptidiques codées, chez l'humain, par le gène *KISS1*, et qui jouent un rôle crucial dans la régulation neurohormonale [76]. La localisation des neurones sécrétant de KP varie selon les espèces ; chez l'humain, ils sont situés dans l'hypothalamus. Ces neurones semblent jouer en outre un rôle majeur dans la sécrétion pulsatile de GnRH chez les mammifères [77]. Ainsi l'administration de KP, centrale ou systémique, stimule-t-elle la libération de GnRH, et, par suite, celle de FSH et de LH par l'hypophyse antérieure [78, 79]. Cet effet, s'il a majoritairement été étudié chez l'animal, a également été observé chez la femme ; il peut en outre être inhibé par des antagonistes de la GnRH [80]. Abbara *et al.* [81] ont récemment montré que la KP-54 était une approche pertinente pour induire la maturation ovocytaire, et ont rapporté des naissances vivantes obtenues de cette façon chez des femmes à haut risque de SHO et bénéficiant d'une FIV [81]. Des études randomisées de plus grande amplitude, comparant les KP aux déclencheurs habituels, sont néanmoins nécessaires avant d'envisager leur commercialisation et leur utilisation en routine.

Stratégies de soutien de la phase lutéale

Si les méthodes de soutien de la phase lutéale ne sont pas le principal sujet de cet article, elles peuvent être cruciales, dans le cadre de la FIV, pour le bon déroulement des premiers temps de la grossesse. Plusieurs éléments suggèrent en effet que la phase lutéale présente des défaillances dans le cadre d'une FIV, indépendamment de l'usage ou non d'agonistes ou d'antagonistes de la GnRH. L'utilisation de GnRHa pour déclencher l'ovulation induit en outre un abaissement des taux de progestérone, lequel entraîne une diminution des chances de grossesse [82]. Dans ce contexte, plusieurs options ont été proposées pour soutenir la phase lutéale, en vue de faciliter le transfert d'embryons frais, chez des femmes à risque de SHO, et chez qui l'ovulation est déclenchée par des GnRHa. Kol *et al.* [83] ont ainsi montré que deux bolus de 1 500 UI de hCG – le premier le jour du recueil d'ovocytes, le second quatre jours plus tard – permettaient d'empêcher la lutéolyse après le déclenchement par GnRHa [83]. La mise en place d'un soutien intensif du corps jaune

(progestérone et œstradiol oral) après déclenchement par des GnRHa peut contribuer à l'implantation de l'embryon, bien que le risque de survenue d'un SHO tardif ne puisse être tout à fait écarté [84]. Si l'efficacité de ces méthodes, en termes de taux de grossesses, a été démontrée [85], les protocoles *freeze-all* après déclenchement par GnRHa et transfert différé d'embryon sont devenus le gold standard chez les patientes à haut risque de HSO.

Des études récentes suggèrent que, en cas de sécrétion insuffisante de progestérone et d'œstrogènes par les cellules du corps jaune, l'administration d'un GnRHa durant la phase lutéale pourrait avoir un effet favorable, en supportant le corps jaune via une stimulation de la sécrétion de LH par les cellules gonadotropes, ou directement sur l'endomètre, via l'expression locale de récepteurs à la GnRH [86]. Une étude menée précédemment avait montré que l'administration d'une dose unique de GnRHa six jours après une injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI), c'est-à-dire durant la phase lutéale, améliorait le résultat clinique du protocole, que la SO ait été menée avec agoniste ou antagoniste de la GnRH [87]. Dans le même ordre d'idée, une étude plus récente a montré qu'une administration intranasale de GnRHa contribuait efficacement à soutenir la phase lutéale chez des patientes à forte réponse ovarienne déclenchée par GnRHa, évitant ainsi le SHO [88].

Enfin, une méta-analyse récente, regroupant 2 776 femmes, a conclu qu'il existait un faible niveau de preuve que l'ajout de GnRHa durant la phase lutéale améliorait la probabilité de grossesse, et que de nouvelles investigations devaient donc être menées avant que ce procédé soit transposé à la pratique clinique [89].

Les cas d'insuffisance du corps jaune peuvent également être traités par l'administration de progestérone durant la phase lutéale. Bien que la meilleure modalité d'administration de la progestérone soit encore débattue et l'objet de recherches, les voies intramusculaire et vaginale se sont imposées dans le cadre du soutien à la phase lutéale. Un essai récent a néanmoins conclu qu'il n'existait pas de différence clinique entre les voies sous-cutanée et vaginale, dans le soutien à la phase lutéale chez des patientes en FIV [90]. Pour autant, l'analyse intermédiaire d'une étude de non-infériorité, randomisée et contrôlée, à trois bras, menée sur 645 cycles, a montré que la probabilité de grossesse évolutive, après transfert d'un embryon congelé, était plus faible en cas d'administration de progestérone par voie vaginale [91] ; la randomisation de nouvelles patientes dans le bras d'administration vaginale a, en conséquence, été interrompue. La voie intramusculaire semble donc pouvoir être recommandée en cas de transfert d'embryon congelé ; d'autres études doivent être menées pour évaluer son opportunité à d'autres scénarios de PMA.

**Tableau 1. Interventions clinique
s possibles sur le fonctionnement ovarien en AMP, issues des connaissances acquises de la FIV.**

| | Activation <i>in vitro</i> | SO à départ aléatoire | Double stimulation | Létrozole/ tamoxifène | Déclenchement avec GnRHa/ kisspeptine | Congélation d'ovocyte ou d'embryon | Agoniste de la dopamine/ antagoniste de la GnRH |
|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|---|--|--|
| Patientes atteintes de cancer | | X | | X | X | X | |
| Forte réponse ovarienne | | | | | X | X | X |
| Mauvaises répondeuses | | | X | X | X | X | |
| Femmes ménopausées | X | | | | | | |

Perspectives

Plusieurs éléments suggèrent que la fonction ovarienne et la fertilité pourraient, contre toute attente, être restaurées après une transplantation de moelle osseuse, chez l'animal comme chez l'humain [92]. Au cours des dernières années, un intérêt croissant s'est porté sur les méthodes alternatives à la production *in vitro* de cellules germinales, qui pourraient permettre à des femmes ménopausées désireuses d'avoir des enfants qui soient, biologiquement, les leurs. La production de cellules germinales à partir de cellules souches issues d'embryons ou dérivées de cellules cutanées a déjà été réalisée [93]. La possibilité ainsi confirmée des cellules souches de donner des cellules germinales revêt une grande importance dans le domaine des traitements de l'infertilité. Un article récent a en outre décrit la conversion, chez l'humain, d'une cellule somatique en cellule germinale, par manipulation de gènes de régulation [94]. Si ces résultats sont encourageants, les mécanismes de régulation génétiques et épigénétiques des cycles cellulaires somatiques doivent être plus attentivement étudiés avant que ces méthodes soient applicables en clinique.

Limitations

L'une des principales limites de ce travail est le nombre réduit d'études randomisées qui ont été consacrées à la stimulation en phase lutéale ; la plupart des publications concernent en effet des cas cliniques ou des études rétrospectives fondées sur des critères d'inclusion disparates, portant sur un nombre faible de patientes et entachées de biais dans le design de l'étude. Les résultats sont donc à considérer avec circonspection, et de nombreuses études contrôlées et randomisées, sur un grand nombre de patientes et avec un design satisfaisant,

incluant notamment le suivi du taux de naissances vivantes, devront être menées pour valider l'efficacité de la SO en phase lutéale chez les patientes en FIV, et identifier les meilleurs schémas de stimulation.

Conclusions

Les connaissances récemment acquises sur la physiologie ovarienne ont remis en question les conceptions classiques de la folliculogénèse, et ont conduit à la mise au point de nouveaux protocoles de SO et de nouvelles applications cliniques (tableau 1). La SO en phase lutéale apparaît comme une méthode sûre et efficace d'obtention d'ovocytes compétents, présentant des résultats comparables à ceux des protocoles classiques en termes de naissances et de périnatalité [95]. L'hyperstimulation ovarienne contrôlée à départ aléatoire présente des avantages importants pour les patientes atteintes de cancer et engageant un processus de préservation de la fertilité, en permettant d'engager la SO à n'importe quel moment du cycle menstruel, et réduisant ainsi la durée totale du cycle de FIV. La double stimulation, suivie du transfert d'embryon congelé, est une approche prometteuse pour les patientes mauvaises répondeuses, en cas d'échec des protocoles habituels. Les femmes ménopausées, quant à elles, pourraient bénéficier de l'AIV, qui peut induire le développement de follicules résiduels, et le recueil d'un nombre acceptable d'ovocytes après le traitement de FIV. Des études de cohorte au long cours, ainsi que des essais cliniques randomisés doivent être réalisés sans tarder, afin de définir plus précisément les rôles que ces nouvelles approches peuvent jouer en FIV, avant qu'elles soient intégrées en pratique clinique.

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

Références

1. Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 2011 ; 96 : 277-85.
2. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007 ; 67 : 73-80.
3. Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010 ; 25 : 2239-46.
4. Diamond MP, Tarlatzis BC, De Cherney AH. Recruitment of multiple follicular development for *in vitro* fertilization in the presence of a viable intrauterine pregnancy. *Obstet Gynecol* 1987 ; 70 : 498-9.
5. Rombauts L, Suikkari AM, MacLachlan V, Trounson AO, Healy DL. Recruitment of follicles by recombinant human follicle stimulating hormone commencing in the luteal phase of the ovarian cycle. *Fertil Steril* 1998 ; 69 : 665-9.
6. von Wolff M, Thaler CJ, Frambach T, et al. Ovarian stimulation to cryopreserve fertilized oocytes in cancer patients can be started in the luteal phase. *Fertil Steril* 2009 ; 92 : 1360-5.
7. Hodgen GD. The dominant ovarian follicle. *Fertil Steril* 1982 ; 38 : 281-300.
8. Koering MJ. Comparative morphology of the primate ovary. *Contrib Primatol* 1974 ; 3 : 38-81.
9. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996 ; 17 : 121-55.
10. Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BC. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev* 2015 ; 36 : 1-24.
11. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 ; 110 : 17474-9.
12. Novella-Maestre E, Herraiz S, Rodriguez-Iglesias B, Diaz-Garcia C, Pellicer A. Short-term PTEN inhibition improves *in vitro* activation of primordial follicles, preserves follicular viability, and restores AMH levels in cryopreserved ovarian tissue from cancer patients. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0127786.
13. 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.
14. Kawamura K, Cheng Y, Sun YP, et al. Ovary transplantation: to activate or not to activate. *Hum Reprod* 2015 ; 30 : 2457-60.
15. Zhai J, Yao G, Dong F, et al. *In vitro* activation of follicles and fresh tissue auto-transplantation in primary ovarian insufficiency patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2016 ; 101 : 4405-12.
16. Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 2001 ; 55 : 1211-39.
17. Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* 1988 ; 39 : 308-17.
18. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. *Fertil Steril* 2003 ; 80 : 116-22.
19. Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine. Society for assisted reproductive technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril* 2013 ; 99 : 37-43.
20. Madrigano A, Westphal L, Wapnir I. Egg retrieval with cryopreservation does not delay breast cancer treatment. *Am J Surg* 2007 ; 194 : 477-81.
21. Bedoschi GM, de Albuquerque FO, Ferriani RA, Navarro PA. Ovarian stimulation during the luteal phase for fertility preservation of cancer patients: case reports and review of the literature. *J Assist Reprod Genet* 2010 ; 27 : 491-4.
22. Sonmezer M, Turkcuoglu I, Coskun U, Oktay K. Random-start controlled ovarian hyperstimulation for emergency fertility preservation in letrozole cycles. *Fertil Steril* 2011 ; 95 : Error: FPage (2125.e9) is higher than LPage (212500000011.e)!
23. von Wolff M, Capp E, Jauckus J, Strowitzki T, Germeyer A, FertiPROTEKT study group. Timing of ovarian stimulation in patients prior to gonadotoxic therapy: an analysis of 684 stimulations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2016 ; 199 : 146-9.
24. Xu B, Li Y. Flexible ovarian stimulation in a poor responder: a case report and literature review. *Reprod BioMed Online* 2013 ; 26 : 378-83.
25. Kuang Y, Chen Q, Hong Q, et al. Double stimulations during the follicular and luteal phases of poor responders in IVF/ICSI programmes (Shanghai protocol). *Reprod BioMed Online* 2014 ; 29 : 684-91.
26. Ubaldi FM, Capalbo A, Vaiarelli A, et al. Follicular versus luteal phase ovarian stimulation during the same menstrual cycle (DuoStim) in a reduced ovarian reserve population results in a similar euploid blastocyst formation rate: new insight in ovarian reserve exploitation. *Fertil Steril* 2016 ; 105 : 1488-1495.e1.
27. Garzo VG, Dorrington JH. Aromatase activity in human granulosa cells during follicular development and the modulation by follicle stimulating hormone and insulin. *Am J Obstet Gynecol* 1984 ; 148 : 657-62.
28. Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Impact of luteinizing hormone administration on gonadotropin releasing hormone antagonist cycles: an age-adjusted analysis. *Fertil Steril* 2011 ; 95 : 1031-6.
29. Wu Z, Li R, Ma Y, et al. Effect of HCG day serum progesterone and oestradiol concentrations on pregnancy outcomes in GnRH agonist cycles. *Reprod BioMed Online* 2012 ; 24 : 511-20.
30. Zavy MT, Craig LB, Wild RA, Kahn SN, O'Leary D, Hansen KR. In high responding patients undergoing an initial IVF cycle, elevated estradiol on the day of hCG has no effect on live birth rate. *Reprod Biol Endocrinol* 2014 ; 12 : 119.
31. Arslan M, Bocca S, Arslan EO, Duran HE, Stadtmayer L, Oehninger S. Cumulative exposure to high estradiol levels during the follicular phase of IVF cycles negatively affects implantation. *J Assist Reprod Genet* 2007 ; 24 : 111-7.
32. Villasante A, Pacheco A, Ruiz A, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Vascular endothelial cadherin regulates vascular permeability: implications for ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 ; 92 : 314-21.
33. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. *Oncologist* 2006 ; 11 : 422-34.
34. Cakmak H, Katz A, Cedars MI, Rosen MP. Effective method for emergency fertility preservation: random-start controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2013 ; 100 : 1673-80.

35. Kuang Y, Hong Q, Chen Q, *et al.* Luteal-phase ovarian stimulation is feasible for producing competent oocytes in women undergoing *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment, with optimal pregnancy outcomes in frozenthawed embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 2014 ; 101 : 105-11.
36. Oktay K, Hourvitz A, Sahin G, *et al.* Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2006 ; 91 : 3885-90.
37. Azim AA, Costantini-Ferrando M, Oktay K. Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 2630-5.
38. International Breast Cancer Study Group, Colleoni M, Gelber S, *et al.* Tamoxifen after adjuvant chemotherapy for premenopausal women with lymph node-positive breast cancer: international breast cancer study group trial 13-93. *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 1332-41.
39. Cohen I, Figer A, Tepper R, *et al.* Ovarian overstimulation and cystic formation in premenopausal tamoxifen exposure: comparison between tamoxifen-treated and nontreated breast cancer patients. *Gynecol Oncol* 1999 ; 72 : 202-7.
40. Meiorow D, Raanani H, Maman E, *et al.* Tamoxifen co-administration during controlled ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilization in breast cancer patients increases the safety of fertility-preservation treatment strategies. *Fertil Steril* 2014 ; 102 : 488-495.e3.
41. Trounson AO, Leeton JF, Wood C, Webb J, Wood J. Pregnancies in humans by fertilization *in vitro* and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science* 1981 ; 212 : 681-2.
42. Diedrich K, van der Ven H, Al-Hasani S, Krebs D. Ovarian stimulation for *in-vitro* fertilization. *Hum Reprod* 1988 ; 3 : 39-44.
43. Smits J, Devroey P, Braeckmans P, *et al.* Management of failed cycles in an IVF/GIFT programme with the combination of a GnRH analogue and hMG. *Hum Reprod* 1987 ; 2 : 309-14.
44. Damewood MD, Shen W, Zacur HA, Schlaif WD, Rock JA, Wallach EE. Disappearance of exogenously administered human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 1989 ; 52 : 398-400.
45. Yen SS, Llerena O, Little B, Pearson OH. Disappearance rates of endogenous luteinizing hormone and chorionic gonadotropin in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1968 ; 28 : 1763-7.
46. Pellicer A, Simon C, Miro F, *et al.* Ovarian response and outcome of *in-vitro* fertilization in patients treated with gonadotrophin-releasing hormone analogues in different phases of the menstrual cycle. *Hum Reprod* 1989 ; 4 : 285-9.
47. Tan SL, Kingsland C, Campbell S, *et al.* The long protocol of administration of gonadotropin-releasing hormone agonist is superior to the short protocol for ovarian stimulation for *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1992 ; 57 : 810-4.
48. Zorn JR, Boyer P, Guichard A. Never on a Sunday: programming for IVF-ET and GIFT. *Lancet* 1987 ; 1 : 385-6.
49. Toftager M, Bogstad J, Bryndorf T, *et al.* Risk of severe ovarian hyperstimulation syndrome in GnRH antagonist versus GnRH agonist protocol: RCT including 1050 first IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod* 2016 ; 31 : 1253-64.
50. Diedrich K, Diedrich C, Santos E, *et al.* Suppression of endogenous LH increase in ovarian stimulation with the GnRH antagonist cetrorelix. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1994 ; 54 : 237-40.
51. Olivennes F, Cunha-Filho JS, Fanchin R, Boucharde P, Frydman R. The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation. *Hum Reprod Update* 2002 ; 8 : 279-90.
52. Kol S, Homburg R, Alsbjerg B, Humaidan P. The gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol—the protocol of choice for the polycystic ovary syndrome patient undergoing controlled ovarian stimulation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2012 ; 91 : 643-7.
53. Zalmon I, Carvalho G, Ferreira CA. Induction of ovulation with a new drug: clomiphene citrate. *Hospital (Rio J)* 1965 ; 67 : 1249-54.
54. Shepard MK, Balmaceda JP, Leija CG. Relationship of weight to successful induction of ovulation with clomiphene citrate. *Fertil Steril* 1979 ; 32 : 641-5.
55. Teramoto S, Kato O. Minimal ovarian stimulation with clomiphene citrate: a large-scale retrospective study. *Reprod BioMed Online* 2007 ; 15 : 134-48.
56. Singh A, Bhandari S, Agrawal P, Gupta N, Munaganuru N. Use of clomiphene-based stimulation protocol in oocyte donors: a comparative study. *J Hum Reprod Sci* 2016 ; 9 : 159-63.
57. Fotherby K. Potency and pharmacokinetics of gestagens. *Contraception* 1990 ; 41 : 533-50.
58. Phillips A, Hahn DW, Klimek S, McGuire JL. A comparison of the potencies and activities of progestogens used in contraceptives. *Contraception* 1987 ; 36 : 181-92.
59. Sitruk-Ware R, Nath A, Mishell Jr DR. Contraception technology: past, present and future. *Contraception* 2013 ; 87 : 319-30.
60. Wang Y, Chen Q, Wang N, Chen H, Lyu Q, Kuang Y. Controlled ovarian stimulation using medroxyprogesterone acetate and hMG in patients with polycystic ovary syndrome treated for IVF: a double-blind randomized crossover clinical trial. *Medicine (Baltimore)* 2016 ; 95 : e2939.
61. Kuang Y, Chen Q, Fu Y, *et al.* Medroxyprogesterone acetate is an effective oral alternative for preventing premature luteinizing hormone surges in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 2015 ; 104 : 62-70.e3.
62. Zhu X, Ye H, Fu Y. The Utrogestan and hMG protocol in patients with polycystic ovarian syndrome undergoing controlled ovarian hyperstimulation during IVF/ICSI treatments. *Medicine (Baltimore)* 2016 ; 95 : e4193.
63. Zhu X, Zhang X, Fu Y. Utrogestan as an effective oral alternative for preventing premature luteinizing hormone surges in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilization. *Medicine (Baltimore)* 2015 ; 94 : e909.
64. Fabris AM, Cruz M, Legidos V, Iglesias C, Munoz M, Garcia-Velasco JA. Dual triggering with gonadotropin-releasing hormone agonist and standard dose human chorionic gonadotropin in patients with a high immature oocyte rate. *Reprod Sci* 2017 ; 24(8) : 1221-5.
65. Griffin D, Benadiva C, Kummer N, Budinetz T, Nulsen J, Engmann L. Dual trigger of oocyte maturation with gonadotropin-releasing hormone agonist and low-dose human chorionic gonadotropin to optimize live birth rates in high responders. *Fertil Steril* 2012 ; 97 : 1316-20.
66. Lin MH, Wu FS, Lee RK, Li SH, Lin SY, Hwu YM. Dual trigger with combination of gonadotropin-releasing hormone agonist and human chorionic gonadotropin significantly improves the live-birth rate for normal responders in GnRH-antagonist cycles. *Fertil Steril* 2013 ; 100 : 1296-302.

67. Kasum M, Kurdija K, Oreskovic S, Cehic E, Pavicic-Baldani D, Skrgatic L. Combined ovulation triggering with GnRH agonist and hCG in IVF patients. *Gynecol Endocrinol* 2016 ; 32 : 861-5.
68. Mai Q, Hu X, Yang G, *et al.* Effect of letrozole on moderate and severe early-onset ovarian hyperstimulation syndrome in high-risk women: a prospective randomized trial. *Am J Obstet Gynecol* 2017 ; 216 : 42.e1-42.e10.
69. Strickland S, Beers WH. Studies on the role of plasminogen activator in ovulation. *In vitro* response of granulosa cells to gonadotropins, cyclic nucleotides, and prostaglandins. *J Biol Chem* 1976 ; 251 : 5694-702.
70. Zelinski-Wooten MB, Hutchison JS, Hess DL, Wolf DP, Stouffer RL. A bolus of recombinant human follicle stimulating hormone at midcycle induces periovulatory events following multiple follicular development in macaques. *Hum Reprod* 1998 ; 13 : 554-60.
71. Lamb JD, Shen S, McCulloch C, Jalalian L, Cedars MI, Rosen MP. Follicle-stimulating hormone administered at the time of human chorionic gonadotropin trigger improves oocyte developmental competence in *in vitro* fertilization cycles: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 2011 ; 95 : 1655-60.
72. Nakano R, Mizuno T, Kotsuji F, Katayama K, Wshio M, Tojo S. Triggering of ovulation after infusion of synthetic luteinizing hormone releasing factor (LRF). *Acta Obstet Gynecol Scand* 1973 ; 52 : 269-72.
73. Kol S. Luteolysis induced by a gonadotropin-releasing hormone agonist is the key to prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2004 ; 81 : 1-5.
74. Zelinski-Wooten MB, Hutchison JS, Hess DL, Wolf DP, Stouffer RL. Follicle stimulating hormone alone supports follicle growth and oocyte development in gonadotrophin-releasing hormone antagonist-treated monkeys. *Hum Reprod* 1995 ; 10 : 1658-66.
75. Kolibianakis EM, Schultze-Mosgau A, Schroer A, *et al.* A lower ongoing pregnancy rate can be expected when GnRH agonist is used for triggering final oocyte maturation instead of HCG in patients undergoing IVF with GnRH antagonists. *Hum Reprod* 2005 ; 20 : 2887-92.
76. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, *et al.* The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003 ; 349 : 1614-27.
77. Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* 1971 ; 173 : 1036-8.
78. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. Peripheral administration of metastatin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 320 : 383-8.
79. Patterson M, Murphy KG, Thompson EL, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR. Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats. *J Neuroendocrinol* 2006 ; 18 : 349-54.
80. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 ; 102 : 2129-34.
81. Abbara A, Jayasena CN, Christopoulos G, *et al.* Efficacy of Kisspeptin-54 to trigger oocyte maturation in women at high risk of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) during *in vitro* fertilization (IVF) therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2015 ; 100 : 3322-31.
82. Shapiro BS, Andersen CY. Major drawbacks and additional benefits of agonist trigger—not ovarian hyperstimulation syndrome related. *Fertil Steril* 2015 ; 103 : 874-8.
83. Kol S, Humaidan P, Itskovitz-Eldor J. GnRH agonist ovulation trigger and hCG-based, progesterone-free luteal support: a proof of concept study. *Hum Reprod* 2011 ; 26 : 2874-7.
84. Iliodromiti S, Lan VT, Tuong HM, Tuan PH, Humaidan P, Nelson SM. Impact of GnRH agonist triggering and intensive luteal steroid support on live-birth rates and ovarian hyperstimulation syndrome: a retrospective cohort study. *J Ovarian Res* 2013 ; 6 : 93.
85. Humaidan P, Engmann L, Benadiva C. Luteal phase supplementation after gonadotropin-releasing hormone agonist trigger in fresh embryo transfer: the American versus European approaches. *Fertil Steril* 2015 ; 103 : 879-85.
86. Pirard C, Donnez J, Loumaye E. GnRH agonist as novel luteal support: results of a randomized, parallel group, feasibility study using intranasal administration of buserelin. *Hum Reprod* 2005 ; 20 : 1798-1804.
87. Tesarik J, Hazout A, Mendoza-Tesarik R, Mendoza N, Mendoza C. Beneficial effect of luteal-phase GnRH agonist administration on embryo implantation after ICSI in both GnRH agonist and antagonist-treated ovarian stimulation cycles. *Hum Reprod* 2006 ; 21 : 2572-9.
88. Bar-Hava I, Mizrahi Y, Karfunkel-Doron D, *et al.* Intranasal gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) for luteal-phase support following GnRHa triggering, a novel approach to avoid ovarian hyperstimulation syndrome in high responders. *Fertil Steril* 2016 ; 106 : 330-3.
89. Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA, Nastro CO. GnRH agonist during luteal phase in women undergoing assisted reproductive techniques: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016 ; 47 : 144-51.
90. Doblinger J, Cometti B, Trevisan S, Griesinger G. Subcutaneous progesterone is effective and safe for luteal phase support in IVF: an individual patient data meta-analysis of the phase III trials. *PLoS One* 2016 ; 11 : e0151388.
91. Devine K, Richter KS, Widra EA, McKeeby JL. Vitrified blastocyst transfer cycles with the use of only vaginal progesterone replacement with endometrin have inferior ongoing pregnancy rates: results from the planned interim analysis of a three-arm randomized controlled noninferiority trial. *Fertil Steril* 2018 ; 109 : 266-75.
92. Badawy A, Sobh MA, Ahdy M, Abdelhafez MS. Bone marrow mesenchymal stemcell repair of cyclophosphamide-induced ovarian insufficiency in a mouse model. *Int J Womens Health* 2017 ; 9 : 441-7.
93. Eguizabal C, Montserrat N, Vassena R, *et al.* Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2011 ; 29 : 1186-95.
94. Medrano JV, Martinez-Arroyo AM, Miguez JM, *et al.* Human somatic cells subjected to genetic induction with six germ line-related factors display meiotic germ cell-like features. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 24956.
95. Martinez F, Clua E, Devesa M, *et al.* Comparison of starting ovarian stimulation on day 2 versus day 15 of the menstrual cycle in the same oocyte donor and pregnancy rates among the corresponding recipients of vitrified oocytes. *Fertil Steril* 2014 ; 102 : 1307-11.
96. De Mello Bianchi PH, Serafini P, Monteiro da Rocha A, *et al.* Follicular waves in the human ovary: a new physiological paradigm for novel ovarian stimulation protocols. *Reprod Sci* 2010 ; 17(12) : 1067-1076.