



HAL
open science

Influence des concentrations hormonales folliculaires sur la qualité ovocytaire

Florence Scheffler-Gharieni

► **To cite this version:**

Florence Scheffler-Gharieni. Influence des concentrations hormonales folliculaires sur la qualité ovocytaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Picardie Jules Verne, 2021. Français. NNT : 2021AMIE0094 . tel-03945250

HAL Id: tel-03945250

<https://theses.hal.science/tel-03945250>

Submitted on 18 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de Doctorat
Mention Biologie Santé
Spécialité Physiologie Humaine

Présentée à l'École Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Florence SCHEFFLER

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

***Influence des concentrations hormonales folliculaires sur la
qualité ovocytaire***

Soutenue le 16 décembre 2021, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M ^{me} S. Catteau-Jonard, Professeur, Université de Lille,	Rapporteur
M ^{me} S. Christin-Maitre, Professeur, Université Sorbonne,	Rapporteur
M. M. Ben Khalifa, Professeur, Université Picardie Jules Verne,	Président de jury
M. P. Merviel, Professeur, Université de Bretagne occidentale	Examineur
M ^{me} R. Desailoud, Professeur, Université Picardie Jules Verne,	Directrice de thèse



Remerciements

A mes Maîtres et Juges,

Madame la Professeure Sophie CATTEAU-JONARD,

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse,

Vos enseignements et engagements en gynécologie médicale sont pour moi des exemples à suivre,

Veillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Madame la Professeure Sophie CHRISTIN-MAITRE,

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse,

Vos enseignements passionnants en endocrinologie ont jalonné mon parcours en gynécologie médicale et ont participé aux choix de cette thématique,

Veillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Moncef BEN KHALIFA,

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse,

Votre expertise en assistance médicale à la procréation m'ont permis de parfaire ma formation en médecine de la reproduction,

Je vous remercie de la confiance que vous me témoignerez pour l'avenir,

Veillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Philippe MERVIEL

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse

Vos encadrements et vos conseils lors mon parcours en gynécologie médicale ont construits les bases de ma pratique quotidienne. Votre soutien m'a permis de me lancer dans l'ambitieux projet de la carrière hospitalo-universitaire.

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude et de tout mon respect.

A ma Directrice de Thèse, Madame la Professeure Rachel DESAILLOUD,

Vous m'avez fait l'honneur de bien vouloir assurer la direction de ma thèse.

Je vous remercie de m'avoir guidé dans ce travail, de vos conseils et de votre grande disponibilité. Les nombreuses idées et échanges que nous avons eu m'ont permis d'aiguiser mon sens critique et scientifique.

Je vous remercie de m'avoir enseigné et m'avoir donné le goût à l'endocrinologie, cette spécialité restera liée à ma pratique quotidienne tout au long de ma vie professionnelle.

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude et de tout mon respect.

À ma famille, mes amis, mes collègues,

A toute l'équipe du service de médecine et biologie de la reproduction, je vous remercie pour votre soutien quotidien tant au plan professionnel que personnel. Je vous remercie pour toute l'aide apportée lors de la réalisation et la rédaction de cette thèse ainsi que pour les autres projets de recherche menés dans le service. C'est un vrai plaisir de faire partie de cette équipe et de continuer à travailler ensemble ces prochaines années.

A mes amis d'ici et d'ailleurs pour leur soutien indéfectible tout au long de ses années sans qui se travail n'aurait pas pu aboutir.

A ma famille, mon socle sans faille.

Résumé

Objectif :

Les objectifs de ce travail étaient : - de déterminer les concentrations des hormones de l'axe thyroïdienne, somatotrope et de la vitamine D dans le liquide folliculaire (LF), ainsi que la présence d'anticorps antithyroïdiens (ACAT) ; - et d'analyser les associations de ces données avec les différents paramètres de fécondation in vitro (FIV).

Matériel et méthodes :

Une étude prospective a été menée dans le service de Médecine et Biologie de la Reproduction du CHU-Amiens Picardie. Les couples inclus étaient ceux bénéficiant d'une 1^{ère} ou 2^{ème} tentative de FIV. Les femmes incluses étaient euthyroïdiennes et de moins de 36 ans, les hommes devaient être âgés de moins de 45 ans avec une numération spermatique supérieure à $5 \times 10^6/\text{ml}$.

Le dosage de la thyroid stimulating hormone (TSH), la triiodothyronine libre (T3L), thyroxine libre (T4L), l'hormone de croissance (GH), l'insulin-like growth factor 1 (IGF1), la 25 hydroxyvitamine D (25(OH)D) et des anticorps anti-thyroperoxydase (TPO) et anti-thyroglobuline (TG) a été réalisé dans les LF et le sérum le jour de la ponction ovocytaire. 3 analyses ont été réalisées à la recherche :

- D'une corrélation entre les taux folliculaires et sériques,
- D'une association entre les taux folliculaires et la qualité d'une cohorte ovocytaire,
- D'une association entre les taux folliculaires et les issues de tentatives de FIV.

Résultats :

Une corrélation positive a été observée entre les taux sériques et folliculaires pour les hormones TSH, T3L, T4L, IGF1, 25(OH)D et les ACAT, mais pas pour la GH.

Lors de l'analyse d'une cohorte d'ovocytes, une moindre proportion d'anomalies morphologiques ovocytaires est associée à des concentrations folliculaires plus élevées en GH et IGF1.

L'obtention d'une grossesse en FIV est associée à une plus haute concentration folliculaire en 25(OH)D.

Conclusion :

Les concentrations en GH, IGF1 et 25(OH)D folliculaires sont associées aux résultats de tentatives de FIV +/- ICSI dans notre population. Il serait nécessaire de confirmer nos résultats dans une plus large cohorte.

Mots clés : Fécondation in vitro, liquide folliculaire, thyroid stimulating hormone, hormones thyroïdiennes, anticorps antithyroïdiens, hormone de croissance, insulin-like growth factor 1, 25 hydroxyvitamine D, anomalies morphologiques ovocytaires

Abstract

Title: Influence of follicular hormonal levels on oocyte quality.

Objective:

The objectives of this work were: - to determine the concentrations of the thyrotropic and somatotropic axis hormones and vitamin D in follicular fluid (FF), as well as the presence of antithyroid antibodies (ATA); - and to analyze the associations of these data with various parameters of in vitro fecundation (IVF).

Material and methods:

A prospective study was conducted in the Reproductive Medicine and Biology department of the CHU-Amiens Picardie. The couples benefiting from a first or second IVF cycles were included. The women included were euthyroid and under 36 years old, the men had to be under 45 years old with a sperm count greater than $5 \times 10^6/\text{ml}$.

The assay of thyroid stimulating hormone (TSH), free triiodothyronine (fT3), free thyroxine (fT4), growth hormone (GH), insulin-like growth factor 1 (IGF1), 25 hydroxyvitamin D (25OHD) and anti-thyroperoxidase (TPO) and anti-thyroglobulin (TG) antibodies were obtained in FF and serum on the day of oocyte retrieval. 3 analyzes were carried out:

- A correlation between follicular and serum levels,
- An association between follicular levels and the quality of an oocyte cohort,
- An association between follicular levels and IVF outcomes.

Results:

A positive correlation was observed between serum and follicular levels for the hormones TSH, T3L, T4L, IGF1, 25OHD and ACAT, but not for GH.

When analyzing a cohort of oocytes, a lower proportion of oocyte morphological abnormalities is associated with a higher follicular level of GH and IGF1.

Obtaining a pregnancy after IVF is associated with a higher follicular 25OHD levels.

Conclusion:

Follicular GH, IGF1, and 25OHD are associated with the results of IVF +/- ICSI cycles in our population. It would be necessary to confirm our results in a larger cohort.

Key words: in vitro fecundation, follicular fluid, thyroid stimulating hormone, thyroid hormones, antithyroid antibodies, growth hormone, insulin-like growth factor 1, 25-hydroxy vitamin D, oocyte morphological abnormality

Table des matières

Remerciements	4
Résumé	6
Abstract	7
Table des matières	8
Liste des annexes	13
Tables des tableaux	14
Tables des figures	15
Abréviations	16
Introduction	19
Partie 1 : État de l'art : axes thyroïdienne, somatotrope et vitamine D, rôles dans la physiologie ovarienne et association avec les résultats en AMP	22
I. Introduction et rappels physiologiques	22
A. Axe thyroïdienne	22
B. Axe somatotrope	24
C. Vitamine D	25
II. Détection hormonale et expressions de récepteurs	25
A. Axe thyroïdienne	25
1. TSH et son récepteur	25
2. Hormones thyroïdiennes et leurs récepteurs	26
3. Détection des désiodases et de la thyroperoxydase	26
4. Détection des anticorps antithyroïdiens	26
B. Axe somatotrope	27
1. GH et son récepteur	27

2.	IGF1/2 et leurs récepteurs	28
3.	IGFBPs	29
C.	Vitamine D	30
III.	Rôles physiologiques dans le fonctionnement ovarien	33
A.	Axe thyroïdienne	33
1.	Axe thyroïdienne et folliculogénèse	33
2.	Axe thyroïdienne et stéroïdogénèse	34
3.	Axe thyroïdienne et qualité ovocytaire / embryonnaire	35
B.	Axe somatotrope	36
1.	GH et fonction ovarienne	36
a.	GH et folliculogénèse ovarienne	36
b.	GH et stéroïdogénèse ovarienne	37
c.	GH et qualité ovocytaire	38
d.	GH et qualité embryonnaire	39
2.	IGF1/2 et IGFBPs et fonction ovarienne	40
a.	IGFs et folliculogénèse ovarienne	40
b.	IGFs et stéroïdogénèse ovarienne	41
c.	IGFs et qualité ovocytaire	42
d.	IGFs et qualité embryonnaire	43
3.	IGFBPs et fonction ovarienne	43
C.	Vitamine D	45
1.	Vitamine D et fertilité	45
2.	Vitamine D et folliculogénèse	45
3.	Vitamine D et stéroïdogénèse	46
IV.	Résultats en AMP, profils hormonaux et auto-immunité thyroïdienne	50
A.	Axe thyroïdienne	50
1.	Axe thyroïdienne et résultats AMP : analyse des concentrations sériques et folliculaires	50
2.	Hypothyroïdie, infertilité et résultats en AMP	51
3.	Anticorps antithyroïdiens, infertilité et résultats en AMP	52
a.	Épidémiologie	52
b.	Impact des anticorps antithyroïdiens sur les résultats en FIV	53
B.	Axe somatotrope	55
1.	Analyse des dosages hormonaux folliculaires et des résultats de tentatives de FIV	55
2.	FIV et traitement substitutif par GH chez des patientes présentant un déficit en GH (GHD)	57
3.	FIV et traitement adjuvant par GH chez des patientes sans GHD	58
a.	FIV : patientes normo répondeuses	58

b.	FIV : Patientes mauvaises répondeuses	58
c.	FIV et échecs d'implantation	59
d.	MIV	60
e.	Transfert d'embryons congelés	60
4.	Recommandations de prescription en AMP	60
C.	Vitamine D	61
1.	Épidémiologie	61
2.	Impact d'une carence en vitamine D sur les résultats en AMP	62
a.	FIV	62
b.	Don d'ovocytes	65
c.	TEC	65
3.	Ajout d'un traitement substitutif en vitamine D et résultats en AMP	65
a.	FIV	65
b.	TEC	66

Partie 2 : À propos d'un cas : Amélioration de la qualité ovocytaire chez une patiente avec hypopituitarisme : étude du liquide folliculaire **67**

Partie 3 : Description de la population et de l'étude **75**

I.	Objectifs	75
II.	Sélection des couples	75
III.	Flow chart de l'étude	77
IV.	Analyses statistiques	78
V.	Description de la population et des tentatives de FIV+/- ICSI	79

Partie 4: Analyse 1 : Études des concentrations folliculaires **82**

I.	Objectif	83
II.	Matériel et méthodes	83
A.	Recueil des liquides folliculaires	83
B.	Technique de préparation des liquides folliculaires	84
C.	Dosage des hormones et des anticorps antithyroïdiens dans le sérum et les liquides folliculaires ovariens	85
1.	Chronologie des analyses	85
2.	Techniques de dosages et normes sériques	85
III.	Résultats	86

A.	Analyse follicules par follicules	86
B.	Analyse des corrélations folliculo-sériques	91
1.	Axe thyroïdien	91
2.	Axe somatotrope	94
3.	Vitamine D	95
IV.	Discussion	96
Partie 5: Analyse 2 : Étude de la qualité ovocytaire		100
I.	Objectif	101
II.	Matériel et méthodes	101
A.	Évaluation de la maturité et de la qualité ovocytaire	101
B.	Constitution des groupes	102
III.	Résultats	103
A.	Distribution des anomalies ovocytaires	103
B.	Caractéristiques de la population et issues des tentatives d'ICSI	106
C.	Analyse des concentrations sériques et folliculaires	108
Partie 6 : Analyse 3 : Étude des issues de tentatives de FIV+/-ICSI		120
I.	Introduction	121
A.	Axe thyroïdienne	121
1.	Expression utérine des récepteurs	121
2.	Axe thyroïdienne et physiologie utérine	121
B.	Axe somatotrope	121
1.	Détection hormonale et expression des récepteurs	121
2.	Axe somatotrope et physiologie utérine	122
C.	Vitamine D	123
1.	Détection hormonale et expression des récepteurs	123
2.	Vitamine D et physiologie utérine	123
II.	Objectif	124
III.	Matériel et méthodes	124
IV.	Résultats	125
A.	Caractéristiques de la population et des paramètres de tentatives de FIV+/- ICSI	125
B.	Analyse des concentrations sériques et folliculaires	128
Perspectives		145

Conclusion **146**

Bibliographie **148**

Annexes **169**

Liste des annexes

<i>Annexe 1:</i> Synthèse de la détection des acteurs de l'axe somatotrope au niveau ovarien.....	170
<i>Annexe 2:</i> Formulaire de consentement du couple (page 1/2).....	171
<i>Annexe 3:</i> Formulaire de consentement du couple (page 2/2).....	172
<i>Annexe 4:</i> Lettre d'information (page 1/2).....	173
<i>Annexe 5:</i> Lettre d'information (page 2/2).....	174
<i>Annexe 6:</i> Protocoles de stimulation ovarienne.....	175
<i>Annexe 7:</i> Procédure habituelle de tri et de décoronisation ovocytaire.....	177
<i>Annexe 8:</i> Protocole de FIV+/-ICSI, culture et transfert embryonnaire.....	179
<i>Annexe 9:</i> Tri et décoronisation ovocytaire des ovocytes mis en fécondation en ICSI prélevés par la technique « individualisée »	181

Tables des tableaux

Tableau 1: Synthèse de la détection des acteurs de l'axe somatotrope et thyroïdienne, de la 25(OH)D et de leurs récepteurs au niveau ovarien.....	32
Tableau 2: Synthèse des effets de GH, IGF1/2, TSH, T3L, T4L et 1,25(OH)D sur le fonctionnement ovarien	49
Tableau 3: Corrélation entre les concentrations folliculaires en TSH, T4L, T3L et les ACAT et les résultats des tentatives de FIV	51
Tableau 4: Corrélation entre les taux sériques et folliculaires en GH/IGF1/IGF2 et les résultats des tentatives de FIV.....	57
Tableau 5: Corrélation entre les taux sériques et folliculaires en 25(OH)D et les résultats des dosages hormonaux et des tentatives de FIV	64
Tableau 6: Caractéristiques de la population féminine	79
Tableau 7: Paramètres de la population masculine	79
Tableau 8: Paramètres des stimulations ovariennes, paramètres spermatiques, ovocytaires et embryonnaires et issues des tentatives de FIV+/- ICSI.....	81
Tableau 9: Normes de l'IGF1 chez la femme en fonction de l'âge.....	86
Tableau 10: Médiane et extrêmes, moyennes et écart-types et CV des dosages folliculaires par patiente.	87
Tableau 11: Patiente 1 : Résultats de la tentative d'ICSI, des dosages folliculaires et sériques des hormones et ACAT pour les LF prélevés par technique individualisée.....	88
Tableau 12: Patiente 2 : Résultats de la tentative d'ICSI, des dosages folliculaires et sériques des hormones et ACAT pour les LF prélevés par technique individualisée.....	89
Tableau 13: Patiente 3 : Résultats de la tentative d'ICSI, des dosages folliculaires et sériques des hormones et ACAT pour les LF prélevés par technique individualisée.....	90
Tableau 14: Dosages sériques et folliculaires d'une patiente hypopituitaire avant et après traitement par GH et lévothyroxine au cours de FIV	95
Tableau 15: Caractéristiques de la population féminine en fonction de la qualité ovocytaire.....	106
Tableau 16: Réponse ovarienne, description ovocytaire et résultats d'ICSI en fonction de la qualité ovocytaire.	107
Tableau 17: Dosages hormonaux et présence d'ACAT folliculaires et sériques en fonction de la qualité ovocytaire.	109
Tableau 18: Caractéristiques de la population en fonction de l'obtention d'une grossesse.	125
Tableau 19: Caractéristiques des patientes exclues de l'analyse	126
Tableau 20: Résultats de tentatives de FIV +/- ICSI en fonction de l'obtention d'une grossesse	127
Tableau 21: Dosages hormonaux et présence d'ACAT folliculaires et sériques en fonction de l'obtention d'une grossesse	129

Tables des figures

Figure 1: Synthèse de la détection des acteurs de l'axe somatotrope et thyroïdienne, de la 25(OH)D et de leurs récepteurs dans le follicule préovulatoire	31
Figure 2: Flow chart de l'étude	77
Figure 3: Répartition des indications de prise en charge en FIV+/- ICSI	80
Figure 4: Liquides folliculaires avant centrifugation	84
Figure 5: Liquide folliculaire après centrifugation.....	84
Figure 6: Tubes anonymisés avant congélation	84
Figure 7: Corrélation TSH sérique versus TSH folliculaire ($r=0.39$, $p<0.0001$; $n=100$).....	91
Figure 8: Corrélation T3L sérique versus T3L folliculaire ($r=0.20$, $p=0.0498$; $n=94$)	92
Figure 9: Corrélation T4L sérique versus T4L folliculaire ($r=0.59$, $p<0.0001$; $n=94$)	92
Figure 10: Corrélation anticorps anti-TPO sériques versus anticorps anti-TPO folliculaires ($r=0.83$, $p<0.0001$; $n=74$)	93
Figure 11: Corrélation anticorps anti-TG sériques versus anticorps anti-TG folliculaires ($r=0.99$, $p<0.0001$; $n=72$)	93
Figure 12: Corrélation GH sérique versus GH folliculaire ($n=37$)	94
Figure 13: Corrélation IGF1 sérique versus IGF1 folliculaire ($r=0.34$, $p=0.039$; $n=37$)	94
Figure 14: Corrélation vitamine D sérique versus vitamine D folliculaire ($r=0.87$, $p<0,0001$; $n=18$)	95
Figure 15: Cycle circadien de la GH (457)	97
Figure 16: Évaluation de maturité ovocytaire	101
Figure 17: Évaluation des anomalies morphologiques ovocytaires	102
Figure 18: Répartition du type d'anomalies morphologiques dans les cohortes ovocytaires	103
Figure 19: Répartition du nombre d'ovocytes et d'anomalies ovocytaires par patientes dans les cohortes ovocytaires	105
Figure 20: Flow chart de l'analyse des issues de tentatives de FIV +/- ICSI	124
Figure 21: Protocole de stimulation agoniste long.....	175
Figure 22: Protocole de stimulation antagoniste	176
Figure 23: Tri et décoronisation ovocytaire avant ICSI	178
Figure 24: Tri ovocytaire et décoronisation ovocytaire pour les seringues « individualisées »	181

Abréviations

1,25(OH)D	1.25 dihydroxyvitamine D ou calcitriol
25(OH)D	25 hydroxyvitamine D
3 β HSD	3 beta hydroxystéroïde déshydrogénase
ACAT	Anticorps antithyroïdiens
AMP	Assistance médicale à la procréation
AMH	Hormone antimüllérienne
AMHR	Récepteur à l'AMH
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BRO	Baisse de réserve ovarienne
CCO	Complexe cumulo-ovocytaire
CFA	Compte des follicules antraux
CG	Cellules de la granulosa
CHU	Centre hospitalier universitaire
CT	Cellules de la thèque
CV	Coefficient de variation
DOI	Désiodase
DIT	Diiodothyrosine
E2	Œstradiol
EPV	Espace périvitellin
ER	Récepteurs aux œstrogènes
ERC	Essai randomisé contrôlé
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
FIV	Fécondation in vitro
FCS	Fausse couche spontanée
FSH	Hormone folliculostimulante
FSHR	Récepteurs à la FSH
GH	Hormone de croissance
GHD	Déficit en GH
GHIH	Somatostatine/Growth hormone-Inhibiting Hormone
GHR	Récepteur à la GH

GHRH	Growth hormone releasing Hormone
GHRHR	Récepteur à la GH-RH
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
GP	Globule polaire
hCG	Hormone chorionique gonadotrophine humaine
HT	Hormones thyroïdiennes
ICSI	Injection intracytoplasmique de spermatozoïdes
IGF	Insuline like growth factor
IGFBP	Insuline like growth factor binding proteins (IGFBPs)
IGFR	Récepteurs aux IGFs
IMC	Indice de masse corporelle
IOP	Insuffisance ovarienne prématurée
kDa	Kilodaltons
KO	Knockout
LF	Liquide folliculaire
LH	Hormone lutéinisante
LHR	Récepteur à la LH/hCG
MII	Métaphase II
MIT	Monoiodothyrosine
MIV	Maturation in vitro
NA	Non applicable
NR	Non réalisé
NS	Non significative
PHRC	Programme hospitalier de recherche clinique
PN	Pronuclei
P	Progestérone
PTU	Propylthiouracil
PV	Pellucide vide
rT3	Triiodothyronine reverse
SHBG	Sex hormone-binding globulin
SOPK	Syndrome des ovaires polykystiques
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
T3L	Triiodothyronine libre
T4L	Thyroxine libre

TBG	Thyroxine binding protein
TEC	Transfert d'embryon congelé
TG	Thyroglobuline
THS	Traitement hormonal substitutif
TPO	Thyroperoxydase
TR	Récepteur aux hormones thyroïdiennes
TSH	Thyroid stimulating hormone
TSHR	Récepteurs à la TSH
TRH	Thyrotropin realising hormone
VDR	Récepteur à la vitamine D
VG	Vésicule germinative
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Introduction

La prise en charge de l'infertilité d'un couple, notamment en assistance médicale à la procréation (AMP), est une démarche médicale complexe nécessitant la connaissance la plus complète possible de la physiologie de la reproduction humaine et de ses pathologies. Ainsi l'ovaire possède une double fonction : la folliculogénèse et l'ovogenèse qui entraînent la production d'ovocytes matures et la stéroïdogénèse qui permet la synthèse et la sécrétion des hormones stéroïdiennes ovariennes (androgènes, œstrogènes et progestérone). Ces phénomènes sont étroitement liés et leur régulation fine nécessite l'action de nombreux facteurs exocrines, endocrines et paracrines.

Les objectifs de l'AMP sont d'essayer de recréer l'équilibre nécessaire à la maturation de l'ovocyte et du spermatozoïde, à leur mise en fécondation, au développement et à l'implantation d'un embryon dans l'utérus. De multiples facteurs sont impliqués dans le succès de la fécondation in vitro (FIV), en particulier la qualité des gamètes. Avec le développement de l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI), la qualité ovocytaire peut être évaluée avec précision à la fois par sa maturité nucléaire et sa structure morphologique. La qualité des ovocytes contribue au développement d'un embryon optimal pour obtenir une grossesse réussie (1). Cependant après stimulation ovarienne pour FIV, on observe que 10 à 60% des ovocytes présentent des anomalies morphologiques : granulations cytoplasmiques diffuses, corps réfractiles, vacuoles, espace périvitellin élargi avec débris, forme irrégulière, premier globule fragmenté (1-5). Ces variations morphologiques sont mal comprises, mais peuvent résulter de facteurs intrinsèques (âge, anomalies génétiques) ou extrinsèques tels que les protocoles de stimulation et les conditions de culture (1).

Le liquide folliculaire (LF) contenu dans l'antrum des follicules ovariens fournit le micro-environnement nécessaire à la croissance et à la maturation ovocytaire. Il est constitué de nombreux électrolytes (chlore, calcium, magnésium, potassium, sodium), de substrats énergétiques (glucides, lipides, acides aminés) et métabolites (lactates, pyruvates). Il contient des hormones ayant des effets pléiomorphes qui sont impliquées dans la folliculogénèse ovarienne, l'ovogenèse et la stéroïdogénèse (6). Il est le seul environnement auquel sont exposés les cellules de la granulosa et l'ovocyte. Il est donc spécifique à chaque follicule et diffère du sérum. Ainsi de nombreux facteurs, notamment les constituants du liquide folliculaire, peuvent interférer dans le développement ovocytaire et altérer ainsi la physiologie de la reproduction.

Les hormones à effet pléiomorphes agissent sur de nombreux tissus. Les hormones thyroïdiennes (HT) jouent un rôle indispensable au fonctionnement global de l'organisme : elles activent le métabolisme basal et ont une action sur de nombreux tissus (cardiaques, musculaires, digestifs...), sur la résorption osseuse et la thermogenèse. Elles sont par ailleurs indispensables au processus de développement cérébral fœtal et à l'acquisition de l'intelligence et des capacités d'apprentissage (7,8). La fonction thyroïdienne est régulée par de nombreux facteurs et peut être modifiée par la grossesse, par diverses pathologies ou médicaments.

L'hormone de croissance (GH) est responsable d'un vaste éventail d'actions directes et/ou par le biais des insuline like growth factor 1 et 2 (IGF). Elle joue non seulement un rôle dans l'augmentation de la taille et de la densité osseuse, de la masse musculaire pendant l'enfance et l'adolescence, mais aussi dans la régulation du métabolisme des lipides, des glucides et de l'eau corporelle tout au long de la vie. C'est une hormone anabolisante, ayant sensiblement le même effet que l'insuline sur le métabolisme des protéines et des acides aminés (9).

La 25 hydroxyvitamine D (25(OH)D) bien qu'appelée traditionnellement vitamine, est une hormone stéroïdienne synthétisée par la peau; elle a un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme phosphocalcique (10,11). Au-delà de ce rôle, elle intervient dans la différenciation et l'apoptose cellulaire, l'immunomodulation et le métabolisme énergétique (12). Son action est donc très large ; certaines études montrent qu'une régulation des cytokines pro-inflammatoires par la vitamine D limiterait le développement de l'athérosclérose (13,14) et que la carence en vitamine D augmenterait le risque de développement de certains cancers (15).

Plusieurs études ont montré que la thyroid stimulating hormone (TSH), les HT triiodothyronine libre (T3L) et thyroxine libre (T4L), la GH et l'IGF1 ont un rôle sur la fonction ovarienne. Les HT améliorent également la prolifération des cellules de la granulosa (16) et inhibent leur apoptose (17). Elles participent à la stéroïdogenèse en augmentant la sécrétion d'œstradiol et de progestérone par les cellules de la granulosa (18,19). La GH présente à la fois des effets directs et médiés par l'IGF1, stimule la folliculogénèse, la maturation ovocytaire et la stéroïdogenèse (20,21). Plus récemment, la vitamine D a également été décrite comme un acteur de la folliculogénèse ovarienne (22,23).

Nous avons été confrontés au cas d'une patiente présentant un déficit en GH (GHD) associé à une insuffisance thyroïdienne suivie en AMP pour des tentatives FIV, patiente pour laquelle nous observons de nombreuses anomalies morphologiques ovocytaires associées à une altération de la qualité embryonnaire. Ces anomalies ont été corrigées après une substitution par GH, permettant l'obtention d'une grossesse évolutive. Lors de cette prise en charge, nous

avons décidé de nous intéresser à la composition hormonale de son LF en TSH, T3L, T4L, GH, IGF1, 25(OH)D ainsi qu'à la présence des anticorps antithyroïdiens (ACAT) anti-thyroperoxydase (TPO) et anti-thyroglobuline (TG) avant et après substitution par GH.

Devant les variations hormonales folliculaires objectivées et l'amélioration de la qualité ovocytaire chez cette patiente, nous avons décidé d'étudier ces hormones de façon plus large et d'évaluer leurs associations possibles avec différents paramètres de FIV. Le but de ce travail était de mieux comprendre le rôle de ces hormones dans la folliculogénèse ovarienne et l'ovogenèse notamment leur éventuelle association avec la qualité des ovocytes. Seule l'association entre les stéroïdes sexuels folliculaires et la qualité ovocytaire avait précédemment été évalué (24). Nous avons décidé de restreindre notre travail à l'axe somatotrope, thyrotrope, les ACAT et la 25(OH)D en prenant comme point de départ les carences hormonales présentes chez notre patiente, accessibles à une substitution pouvant optimiser la prise en charge en FIV. Les stéroïdes sexuels folliculaires ayant déjà été étudiés par de nombreuses équipes nous ne les avons pas inclus dans notre étude.

Dans un premier temps, nous exposerons une revue de la littérature de l'état des connaissances actuelles sur le rôle des axes thyrotrope et somatotrope et de la 25(OH)D sur le fonctionnement ovarien ainsi que l'impact des variations hormonales sériques et folliculaires sur les résultats en AMP. Puis nous présenterons le case report publié suivi de la population incluse dans notre étude et les 3 analyses qui ont été réalisées pour ce travail de recherche ainsi que les articles rédigés pour certaines de ces analyses :

- **Analyse 1** : Étude des concentrations hormonales en TSH, T3L, T4L, GH, IGF1, 25(OH)D et des anticorps-TPO et anti-TG, dans le sérum et les LF issus de FIV +/- ICSI,

- **Analyse 2** : Études de l'association entre la qualité des ovocytes issus d'ICSI et ces différentes concentrations hormonales et la présence d'ACAT,

- **Analyse 3** : Études d'une association entre les issues de tentatives de FIV +/- ICSI et ces différentes concentrations et la présence d'ACAT.

Partie 1

État de l'art : axes thyroïdienne, somatotrope et vitamine D, rôles dans la physiologie ovarienne et association avec les résultats en AMP

I. Introduction et rappels physiologiques

Cette revue de la littérature s'articule en 3 parties autour des acteurs de l'axe thyroïdienne (TSH, T3L, T4L, anticorps anti-TPO et anti-TG), de l'axe somatotrope (GH, IGF1/2 et leurs protéines de transport : les insuline like growth factor binding Proteins (IGFBPs)) et de la vitamine D. Nous verrons tout d'abord les données existantes sur leur détection dans les LF ovariens et l'expression de leurs récepteurs dans l'ovaire, puis leur rôle dans le fonctionnement ovarien et enfin les associations décrites entre leur concentrations folliculaires et sériques et les résultats en AMP.

A. Axe thyroïdienne

L'axe thyroïdienne fait intervenir 3 acteurs :

- L'hypothalamus qui sécrète la thyrotropin releasing hormone (TRH),
- L'hypophyse antérieure qui sécrète la TSH,
- La thyroïde qui synthétise les HT T3 et T4.

La TSH est sécrétée par les cellules thyroïdiques de l'hypophyse antérieure sous la dépendance de la TRH hypothalamique. Le récepteur à la TSH (TSHR) est présent essentiellement au niveau des cellules folliculaires de la thyroïde. Mais leur présence a été décrite dans diverses cellules comme les lymphocytes, les adipocytes, les fibroblastes rétrooculaires, les cellules neuronales et les astrocytes.

La TSH stimule l'ensemble des processus impliqués dans la formation et la sécrétion de la T4 et la T3, ainsi que la prolifération des cellules folliculaires thyroïdiennes (25). La synthèse des HT s'effectue à partir de la thyroglobuline (TG) et de l'iode apporté par l'alimentation. L'iode va y être métabolisé par la thyroperoxydase (TPO) exprimée par les cellules thyroïdiennes, puis incorporé dans la thyroglobuline sur des résidus tyrosyls. La thyroglobuline

va être internalisée par la cellule thyroïdienne pour subir une protéolyse qui libère les HT : tétraiodothyronine (thyroxine : T4) et triiodothyronine (T3), mais aussi des formes inactives, la diiodothyrosine (DIT) et la monoiodothyrosine (MIT) qui seront recyclées. La thyroïde sécrète principalement la prohormone T4 et en une moindre quantité la T3 dont la principale production est due à une conversion périphérique dans les tissus : désiodation de la T4 en T3 (4/5 de la production), la T3 étant la forme la plus active des HT. Les hormones T3 et T4 exercent un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse et l'hypothalamus en inhibant les sécrétions de TSH et TRH(26). Dans la circulation sanguine, les HT sont liées à des protéines de transport : la thyroxin binding protein (TBG), la transthyrétine et l'albumine. Une très faible fraction est libre (0,03% pour la T4 et 0,3% pour la T3) et représente la forme active des hormones (27). La T4 doit être monodésiodée pour obtenir la forme active des thyronines : la T3. 3 enzymes possèdent cette capacité : la désiodase de type 1 (DOI 1), de type 2 (DOI 2) et de type 3 (DOI 3). La DOI 1 est présente au sein de la thyroïde, du foie, des reins et du système nerveux central. Elle est l'enzyme principale de production de la T3 circulante. Son expression est dépendante de la concentration circulante de T3 et est stimulée par la TSH. La localisation de la DOI 2 est essentiellement hypophysaire et cérébrale. Son activité est augmentée en cas d'hypothyroïdie afin de protéger le cerveau. Elle joue un rôle dans le rétrocontrôle négatif de la T3 sur la synthèse et la sécrétion de la TSH. La DOI 3 est présente majoritairement au sein du placenta, elle joue un rôle essentiel en début de grossesse lorsque la thyroïde fœtale n'est pas encore fonctionnelle. Elle maintient une concentration adaptée de T3 dans la circulation fœtale. Il s'agit essentiellement d'une enzyme inactivatrice, puisqu'elle transforme préférentiellement la T3 en DIT et la T4 en triiodothyronine reverse (rT3) dépourvue d'activité hormonale.

Les HT jouent un rôle d'activateur du métabolisme de base de l'organisme. Elles exercent leurs actions par le biais de récepteurs nucléaires. Ces récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR) sont des récepteurs à la T3 et présents sous 2 isoformes (TR α et TR β). Chez le mammifère, 4 récepteurs aux hormones thyroïdiennes ont été identifiés : TR α 1, TR α 2, TR β 1 et TR β 2 (27).

B. Axe somatotrope

Plusieurs acteurs sont impliqués dans l'axe somatotrope :

- L'hypothalamus : intervenant par 3 hormones :
 - o Deux effecteurs positifs : Growth hormon releasing hormon (GH-RH) et TRH
 - o Un effecteur négatif : Somatostatine/Growth Hormone-Inhibiting Hormone (GHIH)
- L'hypophyse antérieure qui sécrète la GH
- Les organes cibles dont le foie qui sécrètent les IGFs

La GH est sécrétée par les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure (28). Il existe 2 sous-types de récepteur à la GH (GHR) chez l'humain : GHR 1a fonctionnel et 1b considéré comme biologiquement inactif. L'expression principale du GHR1a a été décrite dans l'hypophyse, l'hypothalamus et l'hippocampe (29). Le GHR a été détecté dans le cerveau, la moelle épinière, l'hypophyse, les surrénales, le pancréas, les testicules, l'utérus, les ovaires, l'estomac, l'intestin grêle et la moelle osseuse. La plus importante concentration en GHR est au niveau de l'hypophyse et la plus faible est dans l'intestin grêle et l'ovaire (30). Le système des IGFs est composé des IGF1 et IGF2 et de leurs 2 récepteurs. L'IGF1 a classiquement un rôle dans la croissance post-embryonnaire et l'IGF2 dans la croissance embryonnaire. L'expression du gène de l'IGF1 est principalement contrôlée par la GH, mais d'autres hormones sont impliquées dans cette régulation : stimulation par l'œstradiol, la progestérone, les androgènes, l'insuline ou les hormones thyroïdiennes. La production d'IGF1 est pratiquement ubiquitaire, mais il est majoritairement sécrété par le foie (50%), le muscle, le poumon, le rein et le cartilage en réponse à une stimulation par la GH. Les IGFs sont présents dans la circulation sanguine sous forme liée essentiellement (95%) à des protéines de haute affinité : les IGFBPs 1, 2, 3, 4, 5 et 6. Cette liaison spécifique inactive les IGFs et ce sont les IGFBPs qui assurent la régulation de la biodisponibilité. Seuls 5% des IGFs sont à l'état libre dans le sang circulant. Les IGFBPs peuvent inhiber ou potentialiser les actions de l'IGF sur les cellules cibles. Les IGFBPs sont présentes dans tous les fluides biologiques (2).

C. Vitamine D

La vitamine D est une hormone stéroïde. Le terme « vitamine D » regroupe 2 stéroïdes : la vitamine D2 ou ergocalciférol d'origine végétale et la vitamine D3 ou cholécalciférol qui est synthétisée au niveau l'épiderme à partir du 7-déhydrocholestérol sous l'influence des rayonnements ultraviolets B. On la trouve également dans certains aliments d'origine animale. Elle représente 90-95% de la vitamine D totale. 10% de la vitamine D est apportée par l'alimentation (10,11).

La vitamine D3 subit une première hydroxylation par la 25 hydroxylase au niveau du foie pour former la 25(OH)D, forme non active, de réserve, stockée dans le tissu adipeux. La 25(OH)D est majoritairement liée à une protéine porteuse pour être véhiculée jusqu'au rein : la vitamine D binding protein, le reste est soit lié à l'albumine soit sous forme libre. La 25(OH)D subit ensuite une deuxième hydroxylation dans le rein par la 1- α -hydroxylase pour devenir la 1,25 dihydroxyvitamine D (1,25(OH)D) ou calcitriol. Cette forme est la forme active de vitamine D qui agit via son récepteur nucléaire spécifique, le vitamine D receptor (VDR) sur les organes cibles (intestin, os, reins, parathyroïdes, peau, système nerveux central). En parallèle de cette production rénale majeure, il existe quelques sites de production plus mineurs : le placenta, le cerveau et les macrophages (10,11). La 1- α -hydroxylase s'exprime également au niveau cérébral, au sein de la prostate, du colon et des organes reproductifs (31).

II. Détection hormonale et expressions de récepteurs

La figure 1 et le tableau 1 résumant la localisation de la détection des hormones TSH, T3L, T4L, GH, IGF1 et 25(OH)D et de leurs récepteurs dans les différentes structures histologiques de l'ovaire, ainsi qu'au niveau de l'ovocyte et l'embryon humain.

A. Axe thyroïdienne

1. TSH et son récepteur

La TSH est détectée dans les LF issus de FIV (32–34), elle est corrélée aux taux sériques (32,34), mais sa concentration dans le sérum est plus basse (34).

Les TSHR sont fortement exprimés à la surface de l'épithélium ovarien et de manière plus faible dans le stroma (35). On les observe sur les cellules de la granulosa à partir des

follicules primaires (35,36). Ils sont présents sur les ovocytes à tous les stades de développement (35).

2. Hormones thyroïdiennes et leurs récepteurs

Les HT T3L et T4L sont détectées dans les LF issus de FIV (33,34,37–39) avec une corrélation positive avec la concentration sérique (34,37). La T4L est plus élevée dans le sérum que dans LF (34), on observe l'inverse pour la T3L (34).

Les récepteurs TR α 1, TR α 2 et TR β 1 sont présents au niveau ovarien. TR α 1 et TR β 1 sont fortement exprimés à la surface de l'épithélium et de façon plus faible sur le stroma (analyses d'ovaires prélevés en cœlioscopie) (35,40,41). TR α 2 n'est pas détecté dans l'ovaire (35) mais une autre étude le décrit comme étant présent sur l'épithélium (40). TR α 1 et TR β 1 sont présents sur les cellules de la granulosa à partir des follicules secondaires (35,41). Leur expression augmente pendant la croissance folliculaire (19,38). Les récepteurs TR α 1, TR α 2 et TR β 1 sont détectés sur les cellules de granulosa issues de FIV avec prédominance de TR α 1 (17,37,42). Il a été observé une expression plus importante de TR α 2 chez les femmes infertiles vs fertiles (42).

Toutes les isoformes des récepteurs aux HT sont présentes sur les ovocytes matures issus de FIV (38) et les cellules du cumulus en même quantité (38). Sur des coupes ovariennes, ils sont mis en évidence sur les ovocytes à tous les stades de développement sauf dans le follicule antral (40).

3. Détection des désiodases et de la thyroperoxydase

L'épithélium ovarien ainsi que les cellules de la granulosa expriment les DOI de types 2 et 3, mais pas celle de type 1 (35,40). Ceci indique une possible conversion périphérique possible de la T4 en T3 au sein de l'ovaire. La thyroperoxydase a aussi été mise en évidence dans les cellules de la granulosa (43).

4. Détection des anticorps antithyroïdiens

Les anticorps anti-TG et anti-TPO sont détectés dans les LF issus de FIV (33,34,44), ils sont corrélés aux taux systémiques (34,44). Mais les taux sériques sont plus élevés que les taux folliculaires (34).

Synthèse

- La TSH et son récepteur, les HT et leurs récepteurs sont détectés dans l'ovaire à la fois au niveau des cellules de la granulosa, des cellules stromales et de l'ovocyte.
- L'expression des récepteurs aux HT va varier en fonction du stade du développement folliculaire avec globalement une expression plus importante au fur et à mesure de la croissance folliculaire.
- Les concentrations folliculaires en TSH et HT sont corrélées aux concentrations sériques.
- Les DOI 2 et 3 ainsi que la thyroperoxydase ont été mis en évidence dans les cellules de la granulosa.

B. Axe somatotrope

1. GH et son récepteur

La GH est mise en évidence dans les LF issus de FIV (45–49) et sur des prélèvements d'ovaires issus de cœlioscopie (46,50). La GH sérique est plus haute que celle du LF (47,49), mais elles sont corrélées l'une avec l'autre (49). La GH folliculaire est corrélée au volume du follicule ovarien (45). La concentration en GH folliculaire issus d'ovocytes matures est plus importante que celle d'ovocytes atrétiques (45). La prescription de GH en traitement adjuvant en FIV induit une augmentation de la GH folliculaire (47,51–53) et sérique (53–56).

La GH a été détectée dans les cellules stromales ovariennes, les cellules de la granulosa et les ovocytes quel que soit le stade de développement folliculaire (30,57,58).

Les récepteurs à la GH sont exprimés au niveau de l'ovaire (30). Ils ne sont pas mis évidence sur les cellules de la granulosa des follicules primordiaux et primaires, mais apparaissent à partir du stade des follicules secondaires (57,59). On observe une décroissance de l'immunomarquage au fur et à mesure que le follicule avance dans son développement (59). Ils sont exprimés sur les cellules de la thèques des follicules en croissance, mais absents des follicules atrétiques et des corps jaunes (57,59). Ils sont présents sur l'ovocyte à chaque étape de la folliculogénèse à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (57,59,60) ainsi que sur l'embryon, quel que soit son stade de développement (60).

2. IGF1/2 et leurs récepteurs

L'**IGF1** est détecté dans les LF issus de FIV (45,46,48,61–69,69–79) ou de prélèvements d'ovaires issus de coelioscopie (46,50,68). Comme pour la GH, l'IGF1 est plus élevé dans le sérum que dans le LF (61–63,65,67,68,72,75). L'IGF1 folliculaire est corrélé au taux sérique (61–63,66–68). Il existe une corrélation entre le taux folliculaire en IGF1 et la taille ou le volume folliculaire (45,62,66). On observe une baisse des taux d'IGF1 sériques et folliculaires avec l'âge (63). La prescription de GH en traitement adjuvant en FIV induit une augmentation de la de l'IGF1 folliculaire (53,65,69,80–82) et sérique (53–55,65,69,80,81,83).

L'acide ribonucléique messager (ARNm) de l'**IGF1** est mis en évidence dans l'ovaire dans les cellules de la granulosa à partir du stade préovulatoire (84–86) faisant poser l'hypothèse d'une sécrétion locale sous l'effet de la GH folliculaire. Les concentrations en IGF1 sont plus basses dans les cellules de la granulosa issues de FIV d'ovocytes immatures versus ovocytes matures (85). Il n'est détecté dans les cellules de la thèque qu'à partir du stade de follicule antral (86–88). L'IGF1 n'est pas mis en évidence dans l'ovocyte (84), mais est présent dans l'embryon à partir du stade blastocyste (89,90).

L'**IGF2** est détecté dans les LF issus de FIV (63,65,67,69–74,76,76,91) ou de prélèvements d'ovaires issus de coelioscopie (50). L'IGF2 sérique semble plus élevé que le taux folliculaire (65,72), bien que certaines études n'observent pas de différence entre ces concentrations (63,67). Les données sont aussi contradictoires sur l'existence d'une corrélation (63) ou non (67,72) entre les taux sériques et folliculaires. On n'observe pas de différence entre les taux IGF2 folliculaires en fonction de l'âge (63). La concentration en IGF2 est entre 6 à 8 fois supérieure à celle de l'IGF1 dans le LF (69,72). Il n'existe pas de corrélation entre les taux folliculaires d'IGF1 et d'IGF2 (63).

L'ARNm de l'**IGF2** a été détecté dans les cellules stromales ovariennes (84,88) et les cellules de la thèque (86,88). Il est présent dans les cellules de la granulosa quel que soit le stade de développement folliculaire avec une concentration qui augmente progressivement pour être maximale dans les follicules préovulatoires (84–86,88,92–95). On n'observe pas de différence sur la quantité d'IGF2 dans les cellules de granulosa en fonction du volume du follicule ovarien ponctionné (94). L'IGF2 est mis en évidence sur l'ovocyte (84,87,89) et sur l'embryon à tous les stades de son développement (89,90). Sur l'embryon, on observe que l'expression des gènes IGF1/2 augmente lors de son développement (90).

Dans l'ovaire, les récepteurs à l'IGF1 (IGFR) sont exprimés sur les cellules du stroma ovarien (88,95–98) et les cellules de la thèque (88,96,97,99,100). Ils sont détectés sur les cellules de la granulosa quel que soit le stade de développement folliculaire avec une expression qui augmente progressivement pour être maximale dans les follicules préovulatoires (84–86,88,92,94,96,97,99,101–104). L'immunomarquage est plus important au niveau des cellules thécales par rapport aux cellules de la granulosa et aux ovocytes (96). En FIV, les concentrations en IGF1R sont plus élevées dans les cellules de la granulosa issues d'ovocytes immatures que d'ovocytes matures (85). Cependant, on n'observe pas de différence en fonction du volume du follicule ovarien ponctionné (94). Les IGF1R sont aussi exprimés sur l'ovocyte quel que soit le stade de développement folliculaire (84,89,96,99), ainsi que sur l'embryon à tous les stades embryonnaires (89,90).

Dans l'ovaire, les IGF2R sont exprimés sur les cellules stromales (86,88) et les cellules de thèques (86,88). Ils sont présents sur les cellules de la granulosa quel que soit le stade de développement folliculaire avec une expression qui augmente progressivement pour être maximale dans les follicules préovulatoires (85,86,88,94). En FIV, l'expression des IGF2R sont plus basses dans les cellules de la granulosa issues de FIV d'ovocytes immatures que d'ovocytes matures (85). Cependant, on n'observe pas de différence selon le volume du follicule ovarien ponctionné (94).

Les IGF2R sont exprimés sur l'ovocyte quel que soit le stade de développement folliculaire (89), ainsi que l'embryon à tous les stades embryonnaires (89,90). On observe chez l'embryon que l'expression en IGF1/2R augmente au fur et à mesure de son développement (90).

3. IGFBPs

Les IGFBP1, 2, 3, 4, 5 et 6 sont détectées dans les LF issus de FIV (46,48,67,70,73,74,76,105–107) ou de prélèvements d'ovaires issus de cœlioscopie (46,70,108–111). Une équipe n'observe pas de corrélation entre les taux sériques et folliculaires en IGFBP1 et 3 (67), une autre met en évidence cette corrélation pour l'IGFBP1 (109). La concentration sérique en IGFBP3 est plus élevée que la concentration folliculaire (67) ; l'inverse est observé pour l'IGFBP1 (67,106). Les concentrations en IGFBP2 sont plus faibles dans les follicules dominants que dans les follicules atreétiques ou en croissance (108,110,111). On n'observe pas ces différences pour les IGFBP1 et 3 (70,110,111), en fonction du volume du follicule ovarien (70,73) ou du jour du cycle (70).

Dans l'ovaire, toutes les IGFbps sont présentes dans les cellules stromales, de la granulosa et de la thèque sur des coupes ovariennes (88,112,113) ainsi que dans les cellules de granulosa issues de FIV (92,93,102,103,112,114). L'IGFBP2 est celle qui est détectée en plus grande quantité. Sa concentration est plus importante pour des follicules de plus de 14mm (88). En FIV, les concentrations en IGFBP1-2-3 sont plus élevées dans les cellules de la granulosa issues d'ovocytes matures que d'ovocytes immatures (85,94). L'inverse est observé pour les IGFBP4 et 6 et leur détection est plus marquée dans les petits follicules ovariens (85,94). On ne trouve pas de différence de concentrations en IGFBP2 et IGFBP4 dans les cellules de la granulosa en fonction du volume du follicule ovarien ponctionné contrairement à l'IGFBP5 dont la concentration augmente en fonction de ce volume (94). L'annexe 1 résume la présence des acteurs de l'axe somatotrope au niveau ovarien.

Synthèse

- La GH et son récepteur, l'ARNm des IGF1/2 et leurs récepteurs ainsi que leurs protéines de transport sont détectés dans l'ovaire à la fois au niveau des cellules folliculaires (granulosa et thèque), des cellules stromales et de l'ovocyte.
- Leur expression va varier en fonction du stade du développement folliculaire avec une globalement une expression plus importante au fur et à mesure de la croissance folliculaire.
- Les concentrations folliculaires en GH et IGF1 sont corrélées aux concentrations sériques, les résultats sont plus discutés pour l'IGF2.

C. Vitamine D

Le dosage de la 25(OH)D est le meilleur reflet du statut vitaminique d'un individu du fait de sa plus longue demi-vie et de sa meilleure biodisponibilité. La 1,25(OH)D, ayant une courte demi-vie et une variation constante sous l'effet de la PTH, ne doit pas être utilisée en dosage courant (13).

Chez l'humain, la **25(OH)D** est détectée dans les LF issus de FIV (115–126). Il existe une corrélation positive entre les taux de 25(OH)D sériques et folliculaires (115,116,120,122,123,125,126), les taux folliculaires étant plus bas que les taux sériques (125).

	TSH	TSHR	T3L	T4L	TR α 1	TR α 2	TR β 1	GH	GHR	IGF1	IGF2	IGF1R	IGF2R	25(OH)D	VDR
Liquide folliculaire	+	NA	+	+	NA	NA	NA	+	NA	+	+	NA	NA	+	NA
Épithélium	NR	+++	NR	NR	+++	-/+	+++	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Cellules stromales	NR	+	NR	NR	+	-	+	+	+	NR	+	+	+	NR	+
Granulosa : Follicule primordial	NR	-	NR	NR	-	-	-	+	-	-	+	+	+	NR	NR
Granulosa : Follicule préantral	NR	+	NR	NR	+	-	+	+	++	-	++	++	+	NR	+
Granulosa: Follicule préovulatoire	NR	+	NR	NR	++	-/+	+	+	+	+	+++	++	++	NR	+
Thèque	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	++	++	++	+++	++	NR	+
Ovocytes	NR	+	NR	NR	+	+	+	+	+	-	+	+	+	NR	NR
Embryons	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	+	+	+	+	NR	NR

Tableau 1: Synthèse de la détection des acteurs de l'axe somatotrope et thyroïdienne, de la 25(OH)D et de leurs récepteurs au niveau ovarien.

NA : non applicable, NR : non réalisé

III. Rôles physiologiques dans le fonctionnement ovarien

Les effets physiologiques des acteurs de l'axe thyroïdienne, de l'axe somatotrope et de la vitamine D sur le fonctionnement ovarien sont résumés dans le tableau 2.

A. Axe thyroïdienne

1. Axe thyroïdienne et folliculogénèse

In vitro chez l'animal, l'ajout de T3 chez le rat augmente la prolifération des cellules de la granulosa sur les grands follicules, seule (130) ou en association à l'hormone folliculostimulante (FSH) (131). Cet effet est synergique avec la FSH (132). À l'inverse chez le chat (133) ou le porc (134), l'ajout de T4 ou de T3 dans des cultures de follicules préantraux n'entraîne pas d'effet bénéfique sur la croissance folliculaire et la prolifération des cellules de la granulosa. On n'observe pas de différence sur l'expression des marqueurs de la prolifération tel que le Ki37 (134). Chez le porc, l'ajout de T3 améliore la maturation et la différenciation des cellules de la granulosa notamment lors de la lutéinisation (135,136). Elle augmente le nombre de récepteurs à l'hormone lutéinisante (LH) / hormone chorionique gonadotrophine humaine (hCG) (LHR) induits par la FSH sur les petits et moyens follicules par rapport à une stimulation uniquement par FSH. On n'observe pas cette différence sur les grands follicules (135–137). On observe que les caspases (marqueurs de l'apoptose) sont moins abondantes après ajout de l'ajout T3 à de la FSH sur les petits follicules. On n'observe pas cet effet antiapoptotique avec la T3 seule ou sur les moyens et grands follicules (134).

Chez l'humain in vitro, l'ajout de T3 ou T4 dans des cultures de cellules de la granulosa issues de FIV, réduit l'activité des caspases et a un effet antiapoptotique (138). L'ajout de T3 seule augmente la prolifération cellulaire cependant la FSH inhibe cette action stimulante (16). Sur des ovaires prélevés en cœlioscopie, l'ajout de T3 augmente l'expression des récepteurs aux œstrogènes $Er\alpha$, mais pas $Er\beta1$ et $Er\beta2$ (40).

L'étude de l'impact des pathologies thyroïdiennes chez l'animal et l'humain sur le fonctionnement ovarien permet aussi d'évaluer le rôle de l'axe thyroïdienne sur la folliculogénèse et la stéroïdogénèse. **Ainsi chez le rat prépubère hypothyroïdien**, une altération de la folliculogénèse est observée avec une diminution de la taille des ovaires (139,140), une baisse du nombre de follicules primordiaux, primaires, secondaires, antraux et ovulatoires et une augmentation du nombre de follicules atrétiques (139–143), sans que d'effet

ne soit observé sur la fonction de reproduction adulte (141). Chez le rat adulte, on observe une altération du cycle reproductif au bout de 2-3 semaines en cas d'administration de propylthiouracil (PTU) et d'1 à 2 semaines en cas de thyroïdectomie (140,144–147). On observe aussi une baisse du nombre de follicules primordiaux, primaires et préantraux, sans différence sur les follicules atrétiques (148). Chez les lapins ayant subi une thyroïdectomie, on note aussi un arrêt de la maturation folliculaire ovarienne, et de plus fortes doses de gonadotrophines sont nécessaires pour induire la lutéinisation (149). Chez le rat hypothyroïdien, l'expression de ER β (150) et les concentrations en LHR sont trois fois plus élevées (145). Un traitement par T4/T3 seule ou associée à de l'hCG entraîne une augmentation de la taille des ovaires (147,151) et une normalisation des troubles du cycle (135,136,140–142,144–147). On observe aussi une amélioration de la folliculogénèse : augmentation du nombre de follicules antraux, diminution des follicules atrétiques (144,151).

Chez la femme hypothyroïdienne, des irrégularités menstruelles sont observées : aménorrhée, oligoménorrhée, hypoménorrhée, anovulation, ménométrorragie avec amélioration des troubles sous traitement (152,153). On ne note pas de baisse de la réserve ovarienne (154).

2. Axe thyroïdienne et stéroïdogénèse

In vitro chez l'animal, l'ajout de TSH au milieu de culture de cellules de la granulosa de rats réduit l'activité 3 beta hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β HSD) induite par l'hCG et diminue la sécrétion de progestérone et d'œstradiol (155). Les HT ont en effet synergique avec les gonadotrophines, elles augmentent l'effet médié par la FSH sur l'induction de l'activité de la 3 β HSD et de l'aromatase par les cellules de la granulosa entraînant une augmentation de l'œstradiol chez le porc (135,136,156–158) et le poisson (159). Chez le rat, la T3 améliore l'expression induite par la FSH du cytochrome P450 par les cellules de la granulosa (160). Les HT ont la même action synergique sur la production de progestérone par les cellules lutéales chez le porc (135,136,157,161). L'ajout de T3/T4 seule n'entraîne pas cet effet sur la production d'œstrogènes et de progestérone chez le porc (135,136,156–158,162). On observe dans certaines études que l'expression de l'aromatase par les cellules de la granulosa est réduite par l'ajout de T4 ou de T3 chez le rat (163,164) ou le porc (162,165), entraînant une baisse de la production d'œstradiol chez le porc (165,166) notamment sur de grands follicules (158).

Chez l'humain in vitro, lors de cultures de cellules de la granulosa issues de FIV avec de la T3/T4, on note une augmentation de la sécrétion d'œstradiol (19,167) et de progestérone (18,19).

Chez l'animal, l'hypothyroïdie induit une augmentation de la captation d'iode par l'ovaire et diminue la sensibilité et la réponse aux gonadotrophines (168). Chez le rat hypothyroïdien, on observe une baisse de l'expression ovarienne du cytochrome P450 ainsi que de l'expression des récepteurs à la FSH (FSHR). On note aussi une baisse du taux sérique de FSH, LH et œstradiol (143,147,169,170). Ces effets sont réversibles après l'ajout d'hCG (169) ou de T3 (143,147,169,170). L'ajout de T3 entraîne aussi un meilleur pic de LH (147). Une équipe montre l'inverse sur les gonadotrophines : chez le rat ayant subi une ovariectomie et une thyroïdectomie, on observe une augmentation plus importante de la FSH et de la LH. Cette élévation des gonadotrophines est réversible sous traitement par T4 (144).

Chez la femme hypothyroïdienne, 4 cas ont été rapportés d'hyperstimulation ovarienne spontanée en cas d'hypothyroïdie sévère avec régression des symptômes sous lévothyroxine. Cette hyperstimulation serait la conséquence l'action de la TSH comme FSH-like entraînant une stimulation ovarienne (171). Chez la femme hypothyroïdienne, les troubles du cycle pourraient aussi être liés à une hyperprolactinémie secondaire à une augmentation de la TRH (172). Cette hyperprolactinémie entraînerait une altération de la pulsativité de la gonadotropin-releasing hormone (GnRH) ayant pour conséquence un retard dans le pic de LH et une insuffisance lutéale, la FSH resterait normale (27,173–176). L'hypothyroïdie entraîne une baisse de la sex hormone-binding globulin (SHBG) ayant pour conséquence une baisse du taux d'œstrogène, de la testostérone totale et une augmentation de leur fraction libre (27,173,174,176,177). On observe aussi une baisse de la clairance de l'androstènedione et de l'œstradiol (178). Ces modifications hormonales se normalisent après la mise sous traitement par lévothyroxine (175,177).

3. Axe thyroïdienne et qualité ovocytaire / embryonnaire

In vitro, dans un modèle murin, la TSH seule peut entraîner l'expansion du complexe cumulo-ovocytaire (CCO) (179), mais l'ajout de T3 à la FSH ne modifie pas son expansion (163).

L'hypothyroïdie est associée chez le rat à un taux d'ovulation spontanée plus faible (146) et chez le poisson à une baisse du nombre d'ovocytes matures (180). Chez le rat, un

traitement par lévothyroxine et hCG entraîne une augmentation du nombre d'ovocytes (151). Chez des vaches, l'administration de PTU entraîne une baisse des taux de fécondation et de développement embryonnaire ainsi qu'un nombre de blastocystes plus faible (181). En maturation in vitro (MIV) chez le bovin, l'ajout de T3 dans le milieu de culture augmente le nombre de blastocystes (182).

Les effets des HT en cours d'AMP chez l'humain sont abordés dans la partie IV.A.

Synthèse

- Les HT sont impliquées dans la folliculogénèse et la stéroïdogénèse ovarienne en synergie avec les gonadotrophines.
- Elles stimulent la prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa et de la thèque et ont un effet antiapoptotique.
- Elles participent à la maturation de l'ovocyte et au développement embryonnaire.

B. Axe somatotrope

1. GH et fonction ovarienne

a. GH et folliculogénèse ovarienne

La GH serait nécessaire à toutes les étapes de la folliculogénèse : de l'entrée en croissance des follicules primaires jusqu'au développement des follicules ovulatoires.

In vivo chez l'animal, un traitement adjuvant par GH induit une augmentation du nombre de follicules ovariens du stade primaire au stade antral chez la souris (183,184), la brebis (185) et le bovin (186–190). La GH stimule la prolifération des cellules de la granulosa chez le porc (191). La taille des follicules est augmentée chez le lapin de façon dose dépendante (192) et la poule (193). Elle réduit l'apoptose chez la poule (193).

In vitro chez l'animal, lors de cultures folliculaires, l'ajout de GH au milieu de culture entraîne une meilleure structure des follicules secondaires et stimule la croissance des follicules préantraux chez la chèvre (194). Chez la souris, on observe une augmentation significative de la prolifération des cellules de la granulosa et des cellules thécales (183,195). On note également une réduction de l'apoptose chez le bovin (196,197) et le rat (198,199). Cet effet est dose dépendant et des doses très élevées de GH entraînent l'effet inverse avec un taux de survie folliculaire plus faible (195). On observe les mêmes effets prolifératifs et antiapoptotiques sur

les corps jaunes bovins (200,201). En MIV, l'ajout de GH chez le bovin augmente la prolifération cellulaire des cellules du cumulus et réduit l'apoptose cellulaire (202).

Chez des souris knockouts (KO) GHR/GH, le nombre de follicules primordiaux est élevé, mais les follicules primaires secondaires et antraux sont très peu nombreux avec une augmentation du nombre de follicules atrétiques (203–205).

En FIV humaine, les patientes ayant une baisse de réserve ovarienne ont un plus faible nombre de GHR sur les cellules de la granulosa (206) et un traitement adjuvant par GH augmente leur densité (207).

b. GH et stéroïdogénèse ovarienne

La GH a aussi un rôle dans la stéroïdogénèse ovarienne en potentialisant l'effet des gonadotrophines. **In vivo chez l'animal**, un traitement adjuvant par GH augmente la sensibilité aux gonadotrophines chez la brebis (185). Elle augmente les concentrations périphériques d'insuline, d'IGF1 (186) et l'œstradiol (192).

In vitro chez l'animal, on note un effet direct de la GH sur la stimulation de la stéroïdogénèse en augmentant la production d'œstrogènes et de progestérone sur des cultures de cellules de la granulosa de follicules antraux de rat (208,209), de bovin (210) et de porc (191,211). Chez le rat, elle induit une augmentation du nombre de LHR (212) et de FSHR (209) et une stimulation de la production d'androstérone (213). Chez la brebis (214), le macaque rhésus (215) et le rat (209), la GH augmente l'expression du gène de la protéine StAR (Steroidogenic acute regulatory protein), responsable de la translocation intramitochondriale du cholestérol, première étape de la stéroïdogénèse. Chez le rat, elle augmente le cytochrome p450 responsable de la conversion du cholestérol en prégnélonone ainsi que la 3 β HSD enzyme responsable de plusieurs étapes dans la cascade de la stéroïdogénèse (209). Chez le rat, on observe des effets synergiques à la FSH sur la stéroïdogénèse via la voie MAP kinase (209). La GH stimule aussi la production de progestérone par le corps jaune chez le bovin (200,201). On note une augmentation de la sécrétion d'IGF1 par les cellules de la granulosa et de la thèque chez le porc (191), une stimulation de l'expression de l'IGF1 et de son récepteur chez le rat (209) et de l'IGF2 chez le macaque rhésus (215).

Chez des souris KO GHR/GH, on observe aussi une réponse 3 fois moins importante aux gonadotrophines (204).

On observe aussi les mêmes effets **chez l'humain in vitro** : l'ajout de GH à des cultures de cellules de la granulosa stimule la production d'œstradiol (21,216–220), de progestérone (217,218), de 17 OH progestérone (218) et d'IGF2 (221). Elle augmente la production de progestérone sur des cultures de cellules lutéales (21,220,222). Cet effet est synergique avec les gonadotrophines (223). La GH augmente l'expression du cytochrome p450 nécessaire à la conversion du cholestérol en prégnélonone (218) ainsi que l'activité aromatasase induite par la FSH (216). **En FIV**, un traitement adjuvant par GH entraîne une augmentation de la concentration d'œstradiol et de progestérone dans le sérum (81,224). On observe aussi une augmentation de la 3 β HSD dans les cellules de la granulosa ainsi qu'une baisse des androgènes (81,224). On observe aussi une augmentation de la densité en FSHR sur les follicules de 4 à 16 mm, en LHR sur les follicules de 10 à 16 mm, et des GHR (206). Cette augmentation des GHR sur les cellules de la granulosa est corrélée à la concentration folliculaire en GH (225).

c. GH et qualité ovocytaire

En plus de son rôle sur la folliculogénèse et la stéroïdogénèse, la GH est aussi impliquée dans **l'ovogénèse animale**. La GH seule ne permet pas d'induire une ovulation chez la brebis (226) et le lapin (192), mais elle améliore l'effet des gonadotrophines (227).

In vivo, un traitement adjuvant par GH augmente la maturation ovocytaire chez le lapin (192) et le nombre de follicules contenant des ovocytes en métaphase II (MII) chez la souris (184).

En MIV, l'ajout de GH induit l'expansion et le diamètre du cumulus chez le bovin (228), le cheval (229) et le macaque rhésus (230). Elle accélère la maturation nucléaire ovocytaire chez le rat (231), le lapin (227), le renard (232) et le cheval (229). Cette maturation nucléaire au moment de l'ovulation s'accompagne aussi d'une maturation cytoplasmique. Chez le bovin (233) et le cheval (234), l'ajout de GH augmente la redistribution de ces granules corticaux. La GH permet d'obtenir plus d'ovocytes MII chez le bovin (228,235,236), la jument (234), la chèvre (237) et le mouton (238,239). Les résultats en MIV sur des ovocytes déjà décoronisés sont contradictoires. On n'observe pas de différence sur le nombre d'ovocytes MII chez le bovin (240). À l'inverse chez la souris l'ajout de GH augmente le nombre d'ovocytes MII, seule ou en association avec l'IGF1, cependant leurs effets ne sont pas synergiques (241). Des anticorps anti-IGF1 ne peuvent pas bloquer l'effet de stimulation de la GH sur l'expansion des cellules du cumulus et la maturation des ovocytes dans les follicules bovins évoquant un effet de la GH au moins partiellement indépendant de l'IGF1 (240).

Chez des souris KO GHR, on observe une réduction des taux d'ovulation (204,205).

Chez l'humain, il a été rapporté un cas de MIV rescue sur une cohorte d'ovocytes immatures décoronés (vésicules germinatives (VG)) : l'ajout de GH dans le milieu de culture a permis d'améliorer la maturation ovocytaire et l'obtention d'embryons transférables (242). Cependant, il a été décrit un cas de patiente avec syndrome de Laron suivi en FIV observant un développement normal des follicules ovariens par stimulation par gonadotrophines avec obtention d'ovocytes matures à la ponction malgré de très faibles taux d'IGF1 dans le sérum et liquide folliculaire (243). Les effets de la GH en traitement adjuvant en AMP chez l'humain sont abordés dans la partie IV.B.

d. GH et qualité embryonnaire

La GH semble aussi impliquée dans le développement embryonnaire précoce. En FIV, un traitement adjuvant par GH chez le buffle augmente le nombre d'embryons de bonne qualité (190). En MIV, elle améliore les taux de fécondation et de clivage embryonnaire chez le bovin (233,244,245). Elle augmente le nombre d'embryons J3 chez le macaque rhésus (230) et le bovin (246) et le nombre de blastocystes obtenus chez le bovin (228,244,246), la souris (247) et le mouton (239). Elle améliore la qualité embryonnaire à J5 chez le bétail (248). Elle augmente le nombre de cellules dans les blastocystes de souris (247,249) et le bovin (250). Chez la souris, la GH semble cibler directement le trophoblaste plutôt que la masse cellulaire interne (247), malgré le fait que des GHR soient présents sur les deux types cellulaires (246). Chez le bovin, la GH stimule la prolifération cellulaire du trophectoderme et de la masse cellulaire interne et réduit l'apoptose (250). Elle améliore l'éclosion du blastocyste chez le bovin (245) et chez la souris (251). La GH augmente le taux d'implantation des embryons de souris ayant eu de la GH dans leur milieu de culture (249). Elle améliore la survie des blastocystes vitrifiés après MIV chez le bovin (236).

En plus des effets directs de la GH ou médiés par les IGFs, l'amélioration de la qualité ovocytaire et embryonnaire pourrait être liée à une baisse du stress oxydant. En effet, l'administration in vivo de GH chez le rat diminue les lésions tissulaires induites par une ischémie par un effet antioxydant (252). En FIV chez l'humain, l'ajout d'un traitement adjuvant par GH réduit certains marqueurs du stress oxydant dans le LF (253).

Synthèse

- La GH participe à toutes les étapes nécessaires au développement d'ovocytes matures, de l'initiation de la croissance folliculaire jusqu'au follicule préovulatoire et au maintien du corps jaune en phase lutéale.
- Elle stimule la prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa et de la thèque.
- Elle présente des effets antiapoptotiques et antioxydants.
- Elle est synergique à l'action des gonadotrophines sur la stéroïdogénèse ovarienne.
- Elle participe à la maturation nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte puis au développement embryonnaire.
- Ces actions sont à la fois directes et/ou médiées par l'IGF1.

2. IGF1/2 et IGFBPs et fonction ovarienne

a. IGFs et folliculogénèse ovarienne

L'IGF1 participe au développement des follicules à partir du stade secondaire, mais pas à l'entrée en croissance des follicules primaires. En effet **in vitro chez l'animal**, l'ajout d'IGF1 à différentes concentrations dans les cultures de cortex ovariens de vache ou de rat ne stimule pas la transition du follicule primordial au follicule primaire, mais augmente l'atresie folliculaire (254). Selon Armstrong et al. le système IGF ne serait pas impliqué dans l'initiation de la croissance folliculaire bovine, mais impliqué dans des événements concomitants (255). Il a été démontré chez le rat que l'insuline permettrait la transition du follicule primordial au primaire, mais pas l'IGF1 (256).

En revanche, l'IGF1 a un rôle dans la croissance folliculaire. Dans des cultures folliculaires in vitro de mouton (257), rat (258), chèvre (259), porc (191,260), lapin (261) et bovin (262–264), l'IGF1 stimule la prolifération de la granulosa et de la thèque à partir du stade des follicules secondaires. Il augmente la formation de l'antrum folliculaire et réduit l'apoptose chez le porc (260,265) et le rat (266). Il permet d'accroître le diamètre du follicule chez le bovin (267) et le rat (268). L'ajout d'IGF1 améliore l'ultrastructure des follicules (258). Il augmente le nombre et la sensibilité des récepteurs aux gonadotrophines sur les cellules de la thèque (269) et de la granulosa (270–272) sur des follicules antraux de rat. Chez le bétail et la souris, l'IGF1 semble jouer un rôle clé dans la transition des follicules préantraux vers le stade dépendant aux gonadotrophines (272). Chez la jument, l'injection folliculaire d'IGF1 dans des follicules

secondaires à dose supraphysiologique améliore le phénomène de dominance folliculaire (273). Cet effet stimulateur sur la croissance folliculaire ne semblerait pas être dose dépendant chez le rat (258,274). L'ajout de GH et d'IGF1 dans des cultures de follicules préantraux de souris améliore le développement folliculaire de façon synergique (183).

L'ajout d'IGF2 entraîne aussi une prolifération des cellules de la granulosa chez la chèvre et le mouton (275) et le bovin (276,277).

Chez des souris KO IGF1, on observe la présence de follicules primordiaux et primaires, mais une absence de développement folliculaire normalement au-delà du stade préantral (278,279). Par ailleurs, l'expression des FSHR est sévèrement réduite dans les follicules préantraux, mais est rétablie à des niveaux normaux après 2 semaines de supplémentation exogène en IGF1 (278). Il a été démontré que l'ajout d'anticorps anti-IGFR dans des cultures de follicules secondaires réduit la croissance folliculaire induite par l'IGF1 (275). Chez des souris KO GHR/GH, l'ajout d'IGF1 seul ne permet pas de rétablir une maturation folliculaire chez ces souris (204) argumentant que l'effet de la GH serait indépendant de l'IGF1 dans la croissance folliculaire initiale.

Les mêmes effets sur la prolifération cellulaire ont été observés **chez l'humain**. En folliculogénèse *in vitro*, l'ajout d'IGF1 et 2 réduit l'atésie folliculaire et augmente la proportion de follicules primaires (280). Dans des cultures folliculaires, l'IGF1 est capable de stimuler l'amplification d'ADN des cellules de la granulosa et peut ainsi être un acteur de la prolifération cellulaire (281,282). L'IGF1 stimule la production du vascular endothelial growth factor (VEGF) par les cellules de la granulosa (283). Les actions de l'IGF1 et 2 sont médiées par le récepteur IGF1 (284).

b. IGFs et stéroïdogénèse ovarienne

Les IGFs sont aussi impliqués dans la stéroïdogénèse ovarienne en potentialisant l'effet des gonadotrophines. **Chez l'animal in vitro**, l'IGF1 stimule la sécrétion d'œstradiol et progestérone par les cellules de la granulosa et de la thèque dans les follicules antraux chez le bovin (262,264,267,285), le mouton (257), le porc (191,286), le lapin (261) et le rat (268). Il potentialise la production d'androgènes induite par la LH par les cellules de la thèque (263,287) et l'aromatisation des androgènes en œstrogènes (288). L'IGF1 aurait un effet synergique avec les gonadotrophines sur la prolifération cellulaire et la stéroïdogénèse

(263,264,285,286,289,290). **L'IGF2** améliore la production d'œstradiol et de progestérone chez le bovin *in vitro* (276,277).

Chez des souris KO IGF1, on observe une expression réduite de l'aromatase (278).

Dans des cultures folliculaires humaines, l'**IGF1** stimule la production de VEGF par les cellules de la granulosa (283). Il stimule la production d'androstènedione et de testostérone (291). Il augmente l'activité de l'aromatase dans les cellules de la granulosa (292). L'ajout d'IGF1 augmente la sécrétion d'œstradiol dans des cellules de la granulosa issues de follicules en cours de développement, mais aussi dans des cellules lutéales (219,223,293–297). Il augmente la production de progestérone dans les cellules lutéales (219,295,298,299). Cet effet est synergique avec la FSH (223,293–296) et l'hCG (219,299). Il a été démontré qu'environ 50% des gènes régulant l'expression de la FSH nécessitent l'action de l'IGF1 et suggère ainsi que la croissance folliculaire serait régulée de façon coordonnée entre la FSH et le système des IGFs (300). *In vitro*, l'**IGF2** augmente aussi la production d'œstradiol dans des cultures de cellules de la granulosa (284,301) et de progestérone dans des cultures de cellules de la granulosa lutéinisées (299). Les IGFs augmentent l'expression de la protéine StAR (302).

Par ailleurs, les gonadotrophines et les stéroïdes sexuels joueraient aussi un rôle dans le système des IGFs. En effet, l'ajout de FSH ou d'œstradiol dans des cultures de cellules de la granulosa augmente la production d'IGF1 chez le rat (303) et le porc (304). Chez le singe, un traitement par androgènes augmente l'IGF1 et son récepteur au niveau des ovocytes des follicules primordiaux (305). Chez les souris KO GHR, on observe des taux folliculaires d'IGF1 normaux malgré une maturation folliculaire retardée (203,204) reflétant probablement la capacité d'autres hormones (comme la FSH et l'œstradiol) à activer la production d'IGF1 (304). *In vitro* chez l'humain, l'ajout de FSH ou d'hCG augmente aussi l'expression de l'IGF1 et 2 par les cellules de la granulosa (217,301,306).

c. IGFs et qualité ovocytaire

Les IGFs ont un rôle dans l'obtention d'ovocytes matures aptes à être fécondés. **Chez l'animal *in vitro***, la supplémentation en IGF1 améliore la survie de l'ovocyte chez le rat (258). Il augmente la maturation ovocytaire chez le lapin (261). Chez le rat, l'IGF1 améliore la maturation cytoplasmique en augmentant le nombre de granules corticaux le long de la membrane plasmique ovocytaire (258). Chez la jument, l'injection folliculaire d'IGF1 augmente l'incidence des ovulations multiples (273). En MIV, on observe que l'ajout d'IGF1 améliore le nombre d'ovocytes MII chez la jument (229) et le mouton (238). L'association de

GH et d'IGF1 améliore le nombre d'ovocytes MII de façon synergique (238). Sur des ovocytes immatures décoronés de souris, on observe aussi une augmentation du nombre d'ovocytes MII (241).

Chez des souris KO IGF1, aucune ovulation n'est observée même après stimulation par gonadotrophines exogènes (279).

En MIV chez l'humain, l'ajout d'IGF1 augmente le nombre d'ovocytes matures obtenus (307,308). On observe moins d'anomalies ovocytaires (granuleux, espace périvitellin (EPV) augmenté, globule polaire (GP) fragmenté) après l'ajout d'IGF1 dans le milieu de MIV (308). En FIV, on observe que les taux d'IGF1 folliculaire issus d'ovocytes matures sont supérieurs à ceux issus d'ovocytes atrétiques (45).

d. IGFs et qualité embryonnaire

Les IGFs sont aussi impliqués dans le développement embryonnaire précoce. Lors de culture folliculaire in vitro chez la souris, le développement embryonnaire et le nombre de cellules du blastocyste sont améliorés par l'ajout d'IGF1 (268). En MIV, il augmente les taux de clivage et de développement embryonnaire (J3 et J5) de façon dose dépendante chez le porc (309), le buffle (310), le mouton (238) et le bovin (244). Lors du développement du blastocyste, l'IGF1 augmente la prolifération de la masse cellulaire interne (247). Chez le mouton, l'association GH et IGF1 améliore le nombre d'embryons transférables de façon synergique (238).

L'ajout d'anticorps anti-IGFR ne modifie pas l'action proliférative de la GH sur le trophoctoderme, faisant penser que la GH et l'IGF1 agiraient indépendamment (247).

Chez l'humain en MIV lors d'ajout d'IGF1, on observe une augmentation du nombre d'embryons à 8 cellules et de blastocystes (308).

3. IGFBPs et fonction ovarienne

Les IGFBPs folliculaires entraînent des changements dans la biodisponibilité des IGFs folliculaires et sont ainsi aussi des acteurs dans la folliculogénèse et la stéroïdogénèse ovarienne.

In vitro chez l'animal, on observe chez le rat (311), la brebis (312), le porc (313) et la jument (314), que les concentrations folliculaires en IGFBP 2 et 4 diminuent fortement pendant le développement des follicules de 1 à 2 mm de diamètre jusqu'au stade préovulatoire. Par ailleurs, leurs concentrations et celle de l'IGFBP-5 augmentent dans les follicules atrétiques

chez le ruminant (272) et le porc (313). Ces changements de concentrations sont dus à deux phénomènes : la variation de l'expression de l'ARNm des IGFs et leur dégradation protéolytique. On observe une augmentation de l'activité protéolytique des IGFs lors de la croissance folliculaire avec un maximum atteint pour les follicules préovulatoires chez la jument (314,315), le bovin (316) et le porc (313). À l'inverse, on observe une baisse de l'activité protéolytique lors de l'atresie folliculaire (313,315). Chez le bovin, il a été démontré que la FSH inhibe fortement l'expression de l'ARNm de l'IGFBP-2 dans les cellules de la granulosa, et que l'expression de l'ARNm de l'IGFBP-4 dans les cellules thécales serait inhibée par la LH (317). De plus, la FSH diminue fortement l'expression des ARNm de l'IGFBP-4 et -5 dans les cellules de la granulosa de rat in vitro (318).

Chez l'humain in vitro, il a été démontré une synthèse des IGFs au sein des cellules de la granulosa (102,296,298,319–321). L'ajout d'IGFBP1 ou 3 inhibe la sécrétion d'œstradiol et de progestérone induite par l'IGF1 par les cellules de la granulosa et cellules lutéales en culture (297,322) et l'ajout d'IGF1 (296,298) ou de GH (297) entraîne une inhibition de la production d'IGFBP1.

Nous pouvons supposer que la régulation de l'expression des IGFs dans les follicules préovulatoires serait au moins partiellement dépendante des gonadotrophines. Ainsi la baisse de la concentration folliculaire en IGFs lors de la croissance folliculaire permet d'augmenter la biodisponibilité des IGFs pour stimuler la prolifération des cellules de la granulosa et la stéroïdogénèse. Lors de l'atresie folliculaire, leur augmentation entraîne une baisse des IGFs folliculaires.

Synthèse

- Les IGFs n'ont pas d'implication sur la sortie du pool de réserve des follicules primordiaux, mais seraient un modulateur de la folliculogénèse précoce et tardive.
- Ils stimulent la prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa et de la thèque ainsi que la stéroïdogénèse ovarienne. L'IGF1 aurait un rôle indispensable dans le développement folliculaire à partir du stade follicule secondaire.
- Ils auraient à la fois une action sur la folliculogénèse par une action autocrine et paracrine, mais aussi synergique avec les gonadotrophines et la GH.
- Ces actions sur la folliculogénèse et la stéroïdogénèse sont en partie régulées par la variation des concentrations en IGFs lors du cycle permettant de faire varier la biodisponibilité des IGFs folliculaires.

C. Vitamine D

1. Vitamine D et fertilité

Chez le rat, il est démontré qu'un déficit en vitamine D induit une diminution de la fertilité d'au moins 75%, une baisse des rapports fécondants, de l'effectif des portées et une augmentation des petits poids de naissance (323). Les souris exposées in utero à une carence maternelle en vitamine D présentent des cycles plus irréguliers et oligo-ovulatoires (324). Le mécanisme physiopathologique est débattu. Certains auteurs considèrent que l'hypocalcémie/hypophosphorémie secondaire à la carence en vitamine D et non la carence en vitamine D en elle-même est responsable de cette baisse de fertilité (325,326). En effet, chez des souris KO VDR, le maintien d'un apport élevé de calcium permet de maintenir une fécondité normale (327).

2. Vitamine D et folliculogénèse

Quelques études ont été menées **chez l'animal in vitro** au cours de cultures de cellules de la granulosa. Chez la poule, il a été montré que la supplémentation en 1,25(OH)D augmente la prolifération et la différenciation cellulaire et augmente le nombre de FSHR (328). Chez la chèvre, l'ajout de 1,25(OH)D augmente le nombre de VDR et réduit le nombre de FSHR (329). Chez le macaque rhésus, la prolifération et la survie folliculaire sont améliorées à partir du stade préantral ainsi que la maturation ovocytaire. On observe une augmentation du diamètre des follicules antraux et de la taille de l'ovocyte. Elle augmente la production d'1 α hydroxylase et le nombre de VDR sur les follicules antraux (22,23). Chez la souris KO pour le VDR, il existe une altération de la folliculogénèse ovarienne (330).

Chez l'humain, l'ajout de 1,25(OH)D à des cultures de cellules de la granulosa issues de FIV diminue l'expression du FSHR et du récepteur à l'hormone antimüllérienne (AMH). Ainsi en inhibant l'expression du récepteur à l'AMH, la vitamine D lève l'effet inhibiteur de l'AMH sur la différenciation des cellules de la granulosa et aide les follicules à maturer (117).

Plusieurs études ont cherché une corrélation entre les marqueurs de la réserve ovarienne et le taux de vitamine D sérique. La plupart ne retrouvent pas de corrélation entre la 25(OH)D et les marqueurs de réserve ovarienne (FSH et AMH) (331–335). On n'observe pas non plus de corrélation chez la patiente ayant un syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) (335). Une

étude de plus petite cohorte (33 patientes) a montré une corrélation entre les taux de 25(OH)D et d'AMH avec une variation saisonnière et une augmentation significative de l'AMH sous supplémentation par vitamine D (336). Une autre étude a mis en évidence une corrélation positive entre les taux sériques d'AMH et de 25(OH)D chez des patientes de plus de 45 ans (337). Une étude a mis en évidence une corrélation positive entre la 25(OH)D et le compte des follicules antraux (CFA) (338). Une dernière étude montre une corrélation négative entre les concentrations FSH urinaires et de 25(OH)D sériques (339). Chez des patientes SOPK carencées en vitamine D, un traitement substitutif permet de réduire l'AMH; pour les patientes non SOPK on n'observe pas de variation de l'AMH (340). Deux essais randomisés contrôlés (ERC) ont montré à l'inverse qu'une supplémentation en vitamine D augmentait progressivement le taux d'AMH sérique (341,342).

3. Vitamine D et stéroïdogénèse

In vitro chez l'animal, l'ajout de 1,25(OH)D à des cultures de cellules de la granulosa porcines augmente la production de progestérone (343,344) et d'œstradiol (344,345). Une autre équipe montre à l'inverse une baisse de la production de progestérone (346). Chez la chèvre, l'ajout de 1,25(OH)D augmente l'expression de la protéine StAR et de la 3 β HSD. On observe une augmentation de l'œstradiol et de la progestérone, une baisse du récepteur à l'AMH et de l'expression de l'AMH (329). Chez la poule, on note aussi une diminution de l'expression de l'AMH (328). En folliculogénèse in vitro chez le macaque rhésus, l'ajout de 1,25(OH)D augmente la production d'œstradiol et d'AMH(22). Dans une autre étude menée par la même équipe, ils n'observent pas de différence sur la production d'œstradiol, de progestérone et d'androstènedione, mais une augmentation de l'AMH (23). Chez des souris SOPK, l'ajout de 1,25(OH)D sur des cultures de cellules de la granulosa réduit l'expression de la protéine StAR et de la 3 β HSD ainsi que l'activité de l'aromatase entraînant une baisse de l'œstradiol et de la progestérone (347,348).

Chez la souris KO VDR, l'expression et l'activité de l'aromatase sont significativement diminuées. La supplémentation en calcium permet d'augmenter l'activité de l'aromatase sans la normaliser complètement (330).

Chez l'humain in vitro, il a été démontré que l'ajout de 1,25(OH)D sur des cellules de la granulosa augmente de l'activité 3 β HSD entraînant ainsi une augmentation de la progestérone. On n'observe pas d'effet sur l'aromatase et sur le taux d'œstradiol (117). Une

autre équipe a mis en culture des cellules de la granulosa humaines seules ou au sein de tissus ovariens. Ils ont montré que l'incubation avec de la 1,25(OH)D augmentait la production de progestérone et d'œstradiol sans augmenter la production de testostérone. La vitamine D agirait en synergie avec l'insuline pour augmenter la production d'œstradiol et inhiber l'action de l'IGFBP1 (127).

En FIV, l'ajout de vitamine D chez des patientes carencées ne modifie pas les concentrations folliculaires en androgènes et progestérone et on n'observe pas de corrélation entre les concentrations folliculaires en 25(OH)D et ces hormones. On ne note pas d'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse notamment la synthèse d'œstradiol (120). L'impact de la 25(OH)D sur les résultats de FIV est développé dans la partie IV.C.

Synthèse

- La vitamine D semble moduler la folliculogénèse et la stéroïdogénèse ovarienne. Les mécanismes et réels effets restent cependant mal connus.
- La vitamine D pourrait améliorer les troubles de la folliculogénèse et stéroïdogénèse, notamment dans le modèle du SOPK.

	TSH	T3L	T4L	GH	IGF1/2	1,25(OH)D
Follicules primordiaux				- Initiation croissance	- Atrésie folliculaire	
Follicules primaires		- Anti-apoptotique		- Croissance folliculaire - Prolifération CG - Différenciation cellulaire	- Croissance folliculaire	
Follicules secondaires		- Prolifération CG (+/-), synergie FSH - Maturation et différenciation CG - Augmentation RLH/hCG - Anti-apoptotique	- Maturation et différenciation CG	- Prolifération CG / CT - Différenciation cellulaire - Acquisition LHR et FSHR - Survie folliculaire - Anti-apoptotique	- Prolifération CG / CT - Différenciation cellulaire - Acquisition LHR et FSHR - Réduction atrésie - Anti-apoptotique	
Follicules antraux	- Baisse E2 et P	- Prolifération CG (+/-), synergie FSH - Maturation et différenciation CG - Augmentation RLH/hCG et ER α - Synergie FSH/LH sur stéroïdogénèse : augmentation E2 et P - Anti-apoptotique	- Synergie FSH/LH sur stéroïdogénèse : augmentation E2 et P - Anti-apoptotique	- Prolifération CG / CT - Expansion cellules cumulus - Stimulation stéroïdogénèse CG et CT - Sensibilité gonadotrophines - Augmentation IGF1/IGF1R, IGF2 - Réduction du stress oxydant - Anti-apoptotique	- Prolifération CG / CT - Formation antrum - Expansion cellules cumulus - Stimulation stéroïdogénèse CG et CT - Acquisition RLH et RFSH - Sensibilité gonadotrophines - Dominance - Synthèse VEGF - Anti-apoptotique	- Prolifération/survie CG - Différenciation CG - Augmentation / baisse RFSH - Augmentation / baisse AMH - Baisse AMHR - Augmentation activité 3 β HSD - Augmentation P (+/-) - Augmentation E2 (+/-) - Augmentation VDR - Synthèse 1 α hydroxylase

	TSH	T3L	T4L	GH	IGF1/2	1,25(OH)D
Ovulation	- Expansion CCO	- Augmentation nombre ovocytes	- Augmentation nombre ovocytes	- Potentialise effet gonadotrophines - Dissociation cellules cumulus - Maturation nucléaire et cytoplasmique	- Maturation nucléaire et cytoplasmique - Taux ovulation - Survie ovocytaire - Qualité ovocytaire	-Maturation ovocytaire
Corps jaunes		- Synergie FSH/LH sur stéroïdogénèse : augmentation E2 et P - Lutéinisation	- Synergie FSH/LH sur stéroïdogénèse : augmentation E2 et P - Lutéinisation	- Prolifération cellulaire - Stimulation stéroïdogénèse - Anti-apoptotique	- Prolifération cellulaire - Stimulation stéroïdogénèse CG et CT	
Embryons		- Fécondation et développement embryonnaire	- Fécondation et développement embryonnaire	- Développement embryonnaire - Qualité embryonnaire - Taux de fécondation - Survie embryonnaire après décongélation - Éclosion blastocystes - Anti-apoptotique	- Développement embryonnaire - Qualité embryonnaire	

Tableau 2: Synthèse des effets de GH, IGF1/2, TSH, T3L, T4L et 1,25(OH)D sur le fonctionnement ovarien

CG : cellules de la granulosa, CT : cellules de la thèque, FSH : hormone folliculostimulante, LH : hormone lutéinisante, hCG : Hormone chorionique gonadotrope humaine, RLH : Récepteur à la LH, RFSH : récepteur à la FSH, VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, E2 : œstradiol, P : Progestérone, ER α : récepteurs aux œstrogènes, CCO : complexe cumulo-ovocytaire, AMH : Hormone antimüllérienne, AMHR : Récepteur à l'AMH, 3 β HSD : 3 beta hydroxy-steroidogenase
VDR : récepteur à la vitamine D

IV. Résultats en AMP, profils hormonaux et auto-immunité thyroïdienne

A. Axe thyroïdienne

1. Axe thyroïdienne et résultats AMP : analyse des concentrations sériques et folliculaires

De nombreuses équipes ont évalué l'impact de l'axe thyroïdienne sur les résultats en AMP. Pour ce faire, 24 études ont été répertoriées : 2 méta-analyses, 10 prospectives et 12 rétrospectives ; avec évaluation des résultats des tentatives de FIV en fonction de la TSH au démarrage de la stimulation. Pour toutes ces études deux groupes ont été constitués : **TSH sérique < 2,5 mUI/L ou > 2,5 mUI/L**.

Deux études prospectives réalisées en 2011 (n=1231) (349) et 2017 (n= 270) (349) n'observent pas de différence concernant la réponse à la stimulation : dose totale de gonadotrophines utilisées, nombre de jours de stimulation, taux d'œstradiol au déclenchement. Concernant les paramètres biologiques, elles ne montrent pas de différence sur le nombre d'ovocytes recueillis, le taux de fécondation, le nombre et la qualité embryonnaire.

2 méta-analyses ont été faites en 2018 (Zhao et al, 7 études prospectives et 11 rétrospectives, n=14 486) (350) et 2019 (Jin et al, 2 études prospectives et 10 rétrospectives, n=1185) (351) pour évaluer l'impact de la TSH en début de stimulation sur les issues de FIV. Aucune des deux ne conclue à une différence sur les taux de grossesses et de fausses couches spontanées (FCS). La première ne met pas non plus en évidence de différence sur le taux de naissances vivantes. Ces résultats ont été confirmés en 2020 par l'étude prospective de So et al sur 1479 patientes (352).

Seules deux études rétrospectives (n=232 et n=233) ont été menées dans le cadre du don d'ovocytes, on observe une baisse du taux de grossesses si la TSH de la donneuse est supérieure à 2,5mUI/L et ce indépendamment de la TSH de la receveuse d'ovocytes (353,354), sans différence observées sur le taux de naissances vivantes (353).

Quatre études prospectives ont été menées sur **l'analyse des LF**, les résultats sont synthétisés dans le tableau 3. Lorsque l'on compare les dosages en T3L et T4L folliculaires de donneuses d'ovocytes et de femmes infertiles, on observe que la T4L folliculaire est plus haute chez les femmes infertiles (39).

Concernant la TSH folliculaire, Cai et al ont réalisé une étude prospective incluant 299 patientes observent uniquement une corrélation positive avec le nombre d'embryons de bonne

qualité (34), les autres paramètres biologiques de la FIV ainsi que les chances de grossesse ne sont pas corrélés. Une seconde étude de plus faible effectif (n=60) observe une corrélation négative avec le taux de fécondation sans résultat significatif sur les autres paramètres (355).

Cai et al ont aussi évalué les **HT T4L et T3L folliculaires**. Elles ne sont pas corrélées au nombre d'ovocytes, à la maturation ovocytaire, au taux de clivage ou à la qualité embryonnaire. On observe que les patientes enceintes ont une T4L plus élevée dans le sérum et le LF, non retrouvée pour la T3L (34).

L'influence des ACAT dans le LF sur les paramètres de FIV a aussi été étudiée. On n'observe pas de différence sur le nombre d'ovocytes (33), le taux de fécondation (33,34), le nombre (34) et la qualité embryonnaire (33). Une autre étude prospective de petit effectif (n=31) démontre une baisse du taux de fécondation et moins de « tops » embryons (44). Une étude observe une baisse des taux de grossesses (33) et deux aucun impact (dont celles de Cai et al ayant l'effectif le plus important (n=299)) (34,44).

	TSH	T4L	T3L	ACAT
<i>Nombre d'ovocytes recueillis</i>	nr	NS	nr	NS
<i>Nombre d'ovocytes matures</i>	NS	NS	nr	nr
<i>Taux fécondation</i>	Négative / NS	nr	nr	Négative / NS
<i>Taux clivage embryonnaire</i>	NS	NS	nr	nr
<i>Qualité embryonnaire</i>	Positive / Négative	NS	nr	Négative / NS
<i>Taux de grossesses</i>	NS	Positive	NS	Négative / NS

Tableau 3: Corrélation entre les concentrations folliculaires en TSH, T4L, T3L et les ACAT et les résultats des tentatives de FIV
nr : non réalisé, NS : non significative

2. Hypothyroïdie, infertilité et résultats en AMP

La prévalence de l'hypothyroïdie chez les femmes infertiles est évaluée entre 4 % et 11% (356–358). Une équipe observe jusque 52% d'infertilité dans une cohorte de patientes hypothyroïdiennes.

3 équipes se sont intéressées à comparer les résultats des tentatives de FIV chez des patientes hypothyroïdiennes traitées versus des patientes euthyroïdiennes. Une étude observe

une durée de stimulation plus longue (359), non observée par d'autres (360). On n'observe pas de différence sur la dose totale de gonadotrophines utilisées, l'épaisseur de l'endomètre et le taux d'œstradiol au déclenchement (360). Concernant les paramètres biologiques, on ne note pas de différence sur le nombre d'ovocytes matures et de tops embryons (360). Deux équipes observent une baisse du taux de fécondation (359,360) et une du nombre d'embryons de bonne qualité (359). Les résultats sont partagés sur les issues de tentatives, une étude montre une baisse du taux de grossesses et du taux de naissances vivantes (360), deux autres n'observent pas de différence sur ces paramètres ni sur le taux de FCS (359,361).

L'effet du traitement par lévothyroxine en cas d'hypothyroïdie infraclinique sur les résultats de FIV a été étudié : on n'observe pas de différence sur la dose totale de gonadotrophines (362,363), le nombre d'ovocytes et le taux d'ovocytes MII (362–364), le taux de fécondation (364), le nombre d'embryons total obtenu (364), les taux de transfert et de congélation embryonnaire (362,363). Cependant, une augmentation du nombre d'embryons de bonne qualité a été rapportée (362). Les résultats des issues de grossesse sont à nouveau partagés, certains n'observent pas de différence sur taux de grossesses (359,364,365), de naissances vivantes (359,364) et de FCS (364,365); d'autres démontrent une augmentation du taux de grossesses et de naissances vivantes (362,363) et une diminution des FCS (362,363).

2 méta-analyses ont été réalisées en 2013 et 2018 pour évaluer l'effet d'un traitement par lévothyroxine chez les patientes en AMP avec une hypothyroïdie infraclinique. La première réalisée sur 3 ECR (n=220) trouve une augmentation du taux de naissances vivantes et une baisse du taux de FCS, mais sans impact sur le taux de grossesses (366). La deuxième regroupant 4 ECR (n=787) n'observe aucun effet du traitement par lévothyroxine sur les taux de grossesses et de naissances vivantes ni sur le risque de prématurité, mais démontre aussi une baisse du risque de FCS (367).

3. Anticorps antithyroïdiens, infertilité et résultats en AMP

a. Épidémiologie

La prévalence des ACAT chez les femmes en âge de procréer est estimée entre 5 et 10% (368). La plupart des études montrent une augmentation de la prévalence des ACAT chez les femmes infertiles, elle est évaluée entre 9% et 18% (352,356,369–372) sans différence avec la prévalence dans la population générale (373,374). La méta-analyse de Van Den Boogaard et al montre que la présence d'ACAT augmente le risque d'infertilité idiopathique (371).

Il a été observé dans une population infertile que les patientes endométriosiques présentaient plus d'ACAT (369,375).

On observe aussi une association entre l'insuffisance ovarienne prématurée (IOP) idiopathique et les ACAT (375–377). Certaines équipes observent aussi une baisse de réserve ovarienne décrite par une AMH plus basse chez les patientes avec des ACAT (378,379), d'autres ne mettent pas en évidence cette différence sur l'AMH associée au CFA (380,381). La baisse de l'AMH n'est pas mise en évidence dans une population de jeunes femmes avec des ACAT (10-18ans) suggérant que l'altération de la réserve ovarienne d'origine auto-immune prend du temps et qu'à l'adolescence les effets ne seraient pas encore visibles (382). Le titre d'anticorps anti-TPO n'est pas corrélé à l'AMH dans l'IOP (376).

b. Impact des anticorps antithyroïdiens sur les résultats en FIV

De nombreuses études ont été réalisées pour évaluer l'impact de la présence d'ACAT sériques sur les résultats de FIV. L'auto-immunité thyroïdienne est le trouble immunitaire le plus fréquemment diagnostiqué lors de bilan d'échec d'implantation en FIV : 11,5% d'anticorps anti-TPO et 8,3% d'anticorps anti-TG (383).

3 méta-analyses ont été réalisées en 2010 (Toulis et al, 4 études prospectives, n=1098), en 2015 (Wu et al, 11 études de cohorte) et 2016 (Busnelli et al, 6 études prospectives et 6 études rétrospectives, n=2230) pour évaluer l'impact des ACAT sériques sur les résultats des tentatives de FIV ainsi que 16 études prospectives et 11 rétrospectives.

Il n'est pas mis en évidence de différence concernant les différents critères évaluant la réponse à la stimulation : durée de stimulation (365,384), dose totale de gonadotrophines (365,385), taux d'oestradiol au déclenchement (365,385,386). Une étude prospective a évalué l'impact sur le volume endométrial, il n'a pas été mis en évidence de différence (387).

Concernant les résultats biologiques, la méta-analyse de Busnelli ne montre pas de différence concernant le nombre d'ovocytes recueillis et les taux de fécondation (388). Certaines études prospectives ne mettent pas en évidence de différence pour le nombre d'embryons congelés (389), obtenus ou transférés (384–386). Les résultats sont plus partagés sur la qualité embryonnaire où seules 4 études ont été menées et sur des petits effectifs : deux équipes ne montrent pas de différence sur le nombre d'embryons de grade 1 ou 2 (365,387), 2 autres montrent un plus faible nombre d'embryons de type A (44,390).

Concernant les issues de grossesse en FIV, 3 méta-analyses ne montrent pas de différence sur le taux de grossesse ou d'implantation mais démontrent une augmentation du

risque de FCS (388,391,392). Depuis, Seungdamrong et al ont réalisé en 2017 une étude prospective contrôlée multicentrique sur 1468 patientes qui confirme ces résultats (393). L'étude prospective de So et al. en 2020 sur 1479 patientes n'observe pas non plus de différence sur le taux de grossesse cumulés en FIV (352). Les principales hypothèses proposées pour expliquer l'augmentation du risque de FCS lié à la présence d'ACAT seraient : un défaut généralisé de la balance immunitaire, une baisse des HT fruste pendant la période gestationnelle et ou un biais avec l'âge maternel. L'augmentation du risque de FCS est aussi retrouvé lors des grossesses hors AMP (371,394).

Les résultats sur les taux de naissance vivante sont plus discordants. Les deux premières méta-analyses ne montrent pas de différence sur le taux de naissance vivante (391,392), ainsi l'équipe de Chen en 2017 (étude prospective sur 3763 patientes) (395), alors que la méta-analyse Busnelli et l'étude Seungdamrong mettent elles en évidence une diminution (388,393). Seuls Unuane et al en 2016 ont évalué le taux de naissance cumulé en FIV lors d'une étude rétrospective sur 2406 patients, ils n'observent pas de différence significative (396).

Un ERC sur 600 patientes a été réalisé chez des patientes euthyroïdiennes présentant des anticorps anti-TPO suivies en FIV avec lévothyroxine en traitement adjuvant. On n'observe pas de différence sur le nombre d'ovocytes et d'embryons, la qualité embryonnaire, sur les taux de fécondation, de grossesses évolutives, de FCS ou de naissances vivantes (397). Une seconde étude prospective (n=484) avec le même objectif, n'a pas observé de réduction du risque de FCS (398). A noter que 2 méta-analyses d'ERC (399,400) ont conclu à une réduction du taux de FCS lors de prise de traitement adjuvant par lévothyroxine lors de grossesse hors AMP.

L'ajout d'un traitement adjuvant par lévothyroxine-aspirine-prednisolone améliore tous les paramètres de la stimulation ainsi que le taux de grossesses (390). Une étude prospective a évalué l'ajout de prednisone seule en traitement adjuvant chez ces patientes, il n'a pas été mis en évidence de différence significative sur les paramètres biologiques de la FIV, mais on observe une augmentation du taux de grossesses et de naissances vivantes, mais pas de réduction des FCS (385) pouvant suggérer un effet additionnel des HT.

Synthèse

- La TSH en début de stimulation pour FIV n'est pas corrélées aux différents paramètres de la FIV ni aux issues de tentatives.
- Il existe une augmentation de la prévalence des thyroïdites auto-immunes chez les patientes IOP ou endométriosiques.
- L'hypothyroïdie traitée ne semble pas avoir d'impact sur les résultats de tentatives de FIV, bien que les résultats concernant les issues de grossesse soient contradictoires.
- L'ajout d'un traitement par lévothyroxine pour l'hypothyroïdie infraclinique ne semble pas augmenter les chances de grossesses en FIV, mais entraîne une réduction du taux FCS.
- La présence d'anticorps antithyroïdiens ne modifie pas les paramètres de la stimulation ovarienne ni biologiques de la FIV. Il n'y a pas de baisse des chances de grossesse mais il est démontré une augmentation du risque de FCS.
- L'ajout d'un traitement adjuvant par lévothyroxine en cas de présence d'ACAT réduit le risque de FCS lors de grossesses spontanées mais n'est pas démontré lors de grossesses issues de FIV.

B. Axe somatotrope

1. Analyse des dosages hormonaux folliculaires et des résultats de tentatives de FIV

Des équipes se sont intéressées aux corrélations hormonales sériques et folliculaires de la GH et de l'IGF1 lors de protocoles de FIV avec les différents paramètres de la stimulation et biologiques de la FIV. Les principaux résultats sont résumés dans le tableau 4.

La concentration en **GH folliculaire** présente une corrélation positive avec les taux folliculaires d'oestradiol et d'insuline, et une corrélation négative avec la progestérone folliculaire. Il n'existe pas de corrélation avec la testostérone folliculaire (49). Concernant les résultats biologiques de la FIV, la GH folliculaire serait corrélée de façon positive aux taux de fécondation, de clivage et aux nombres d'embryons à J3 (401). Une autre équipe trouve une corrélation inverse entre la GH folliculaire et le taux de clivage et le nombre d'embryons transférables à J3 (49). Par contre la GH folliculaire serait plus élevée dans le LF des patientes ayant une grossesse suite à une FIV (402).

Concernant la **GH sérique**, on observe une corrélation positive avec le nombre d'ovocytes et d'embryons transférés et les taux de grossesses (403).

Les données sont plus variables concernant l'**IGF1 folliculaire**. Les résultats concernant les taux d'IGF1 et d'oestradiol folliculaire sont discordants : corrélation négative (68), corrélation positive (72) ou pas de corrélation (70). On ne trouve pas de corrélation entre les taux folliculaires d'IGF1 et de progestérone (68,70), de FSH et de LH (68). Certains observent une corrélation négative pour la testostérone folliculaire (68) et d'autres trouvent une corrélation positive avec les androgènes folliculaires (404).

Concernant les paramètres de stimulation, une équipe trouve une corrélation positive entre l'IGF1 folliculaire et la dose totale de gonadotrophines et le nombre de jours de stimulation (64), une autre non (68). À noter que les taux d'IGF1 folliculaires sont plus faibles chez les mauvaises répondeuses (74).

Concernant les résultats biologiques des tentatives d'AMP, on retrouve une corrélation positive entre l'IGF1 folliculaire et le nombre de follicules ponctionnés (64) et le nombre d'ovocytes matures (68) ainsi qu'une concentration plus élevée dans les follicules contenant des ovocytes matures vs des ovocytes atrétiques (45); d'autres ne mettent pas en évidence de corrélation selon le grade de maturation ovocytaire (61,62). Le taux d'IGF1 folliculaire est plus élevé dans les follicules donnant des ovocytes fécondés vs des ovocytes non fécondés (75). En revanche, on n'observe pas de corrélation avec les taux de fécondation (62,64), de clivage (75) et de développement embryonnaire (76). Cependant, il a été trouvé une corrélation positive entre le taux d'IGF1 folliculaire et le nombre d'embryons de bonne qualité transférés (56). Le taux folliculaire d'IGF1 serait plus élevé dans le LF des patientes ayant une grossesse suite à une FIV (402) cependant il n'est pas mis en évidence de corrélation avec le taux de grossesses (79).

Une **concentration sérique en IGF1** plus élevée serait associée à une moindre dose totale de gonadotrophines (62) et à moins de jours de stimulation (64). On ne retrouve pas de corrélation entre l'IGF1 sérique et le taux d'oestradiol (E2) le jour du déclenchement (62,66,68,72,102),

	GH sérique	GH folliculaire	IGF1 sérique	IGF1 folliculaire	IGF2 folliculaire
Dosages hormonaux					
<i>E2 folliculaire</i>	nr	Positive	nr	Positive / Négative / NS	Positive
<i>E2 sérique</i>	Positive	nr	NS	nr	Positive / NS
<i>Progestérone folliculaire</i>	nr	Négative	nr	NS	Positive
<i>Testostérone folliculaire</i>	nr	NS	nr	Positive / Négative	nr
Résultats des tentatives de FIV					
<i>Dose totale FSH</i>	nr	nr	Négative	Négative ou NS	nr
<i>Durée stimulation</i>	nr	nr	Négative	Négative ou NS	nr
<i>Nombre d'ovocytes</i>	Positive	nr	nr	Positive	nr
<i>Taux fécondation</i>	nr	Positive	nr	NS	nr
<i>Taux clivage embryonnaire</i>	nr	Positive / Négative	nr	NS	nr
<i>Taux développement embryonnaire</i>	nr	nr	nr	NS	Positive
<i>Nombre d'embryons J3</i>	Positive	Positive / négative	nr	Positive	nr
<i>Taux de grossesses</i>	Positive	Positive	nr	Positive / NS	nr

Tableau 4: Corrélacion entre les taux sériques et folliculaires en GH/IGF1/IGF2 et les résultats des tentatives de FIV

nr : non réalisé, NS : non significative, E2 : œstradiol, FSH : gonadotrophines

2. FIV et traitement substitutif par GH chez des patientes présentant un déficit en GH (GHD)

Étant donné que la FIV est rarement nécessaire chez les patientes atteintes de GHD, seuls deux case-reports ont décrit l'impact d'une substitution par GH sur les résultats de la FIV. Le premier décrit un effet positif sur l'endomètre lors d'échec d'implantation en FIV chez une femme souffrant d'hypopituitarisme : la GH a amélioré l'épaisseur de l'endomètre permettant l'obtention d'une naissance vivante. Aucune donnée sur la qualité des ovocytes n'a été rapportée (405). Le deuxième cas a observé l'amélioration de la qualité ovocytaire en FIV chez une patiente avec un GHD isolé. Il est rapporté une normalisation de la dysmorphie ovocytaire, notamment l'aspect granuleux cytoplasmique. Une grossesse a été obtenue (406).

Rajesh et al. ont recherché rétrospectivement un GHD isolé chez des patientes suivies en FIV ayant un antécédent de mauvaise réponse ovarienne, d'altération de la qualité ovocytaire ou d'échec d'implantation. Ils ont exclu de leur étude les patientes présentant un hypopituitarisme connu. Ces patientes ont été mises sous GH lors d'une nouvelle tentative de FIV. Ils démontrent une amélioration de la qualité embryonnaire et du taux de fécondation. Il n'y a pas de différence sur le nombre d'ovocytes recueillis ou sur leur maturité, ni sur l'épaisseur endométriale. Les issues de tentatives ne sont pas décrites (407).

3. FIV et traitement adjuvant par GH chez des patientes sans GHD

a. FIV : patientes normo répondeuses

Les études menées ces 30 dernières années sur l'impact d'un traitement adjuvant par GH en FIV chez des patientes sans GHD normo-répondeuses ont été répertoriées : 3 revues Cochrane, 5 ERC, 12 études prospectives contrôlées et 2 rétrospectives. Les 3 revues Cochrane ont évalué l'effet d'un traitement adjuvant par GH sur les résultats en FIV chez des patientes normo-répondeuses en 2003 (408), 2009 (409) et en 2010 (410). Ces 3 revues regroupaient à chaque fois les deux mêmes ERC (n=80). Ils n'observent pas de différence significative sur la dose totale de gonadotrophines utilisées, sur le nombre d'ovocytes recueillis et d'embryons transférés, les taux de grossesses évolutives et de naissances vivantes ou sur la survenue d'effets secondaires.

Depuis 3 autres ERC ont été réalisés sur des effectifs similaires, un par l'équipe de Regan et al en 2018 (n=62) (206), et deux en 2020 par Li et al (n= 158) (411) et Gong et al (n=109) (253). Une équipe observe une augmentation du nombre d'ovocytes recueillis et matures (411), les deux autres non (206,253). Il est observé une augmentation du taux de grossesses cliniques (206,411) et de naissances vivantes (411), non retrouvés pour certains pour le taux de grossesses cliniques (253) ou les taux de naissances vivantes (206).

b. FIV : Patientes mauvaises répondeuses

La littérature concernant l'effet d'un traitement adjuvant par GH sur les résultats en FIV chez des patientes mauvaises répondeuses est la plus abondante avec 2 revues Cochrane, 9 méta-analyses, 19 ERC, 10 études prospectives contrôlées et 9 rétrospectives.

2 revues Cochrane ont été réalisées dans cet objectif en 2003 (408) et 2010 (410) sur les mêmes essais cliniques. Elles démontrent une augmentation significative du taux de naissances vivantes (4 ERC, n=165) et du taux de grossesses évolutives (8 ERC, n=279). Il n'a pas été possible de réaliser une analyse sur le nombre d'ovocytes recueillis à la ponction (1 ERC, n=18). On n'observe pas de différence sur le nombre d'embryons transférés (3 ERC, n=40) ni sur la survenue d'effets indésirables (2 ERC, n=38).

Plus récemment, 9 méta-analyses d'ERC ont été réalisées entre 2009 et 2020. On observe qu'un traitement adjuvant par GH réduit la dose totale de gonadotrophines utilisées et la durée du traitement (412–416). Il est observé un taux d'œstradiol au déclenchement plus élevé (412,416,417), une augmentation du nombre d'ovocytes recueillis et matures (412–418) ainsi que du nombre d'embryons transférés ou transférables (416–419). La majorité des études mettait en évidence une augmentation du taux de grossesses cliniques (412–415,418,419). Les résultats sont plus partagés concernant les taux de naissances vivantes avec 4 études montrant un bénéfice (412,415,419,420) et 3 n'en montrant pas (413,414,418).

Un ERC ne démontre pas de différence sur les issues néonatales (taille, poids, périmètre crânien et apgar) (421).

c. FIV et échecs d'implantation

Un ERC a été réalisé en 2018 (n=105) dans le cadre d'échecs d'implantation chez des patientes prise en charge en don d'ovocytes avec ajout de la GH à la receveuse d'ovocytes en parallèle de la préparation endométriale. On observe une augmentation de l'épaisseur endométriale, du taux de grossesses cliniques et de naissances vivantes (422).

Deux études prospectives contrôlées non randomisées ont été réalisées en 2009 (n=245) (423) et 2018 (n=42) (225) chez des patientes en échec d'implantation en FIV. La première montre une baisse des doses totales de gonadotrophines, une augmentation de l'œstradiol au déclenchement, du nombre d'ovocytes recueillis et mis en fécondation, et du nombre d'embryons transférables (423). La seconde n'observe pas ces différences, mais met en évidence une augmentation de l'épaisseur endométriale (225). Pour les 2 études, on observe une augmentation du taux de grossesses cliniques et du taux de naissances vivantes (225,423).

d. MIV

Deux études prospectives sur 88 (424) et 252 (425) ICSI ont évalué l'effet de l'ajout de GH dans le milieu de culture en MIV. On observe une augmentation significative du taux de maturation ovocytaire (424,425) ainsi que du taux de fécondation et de clivage embryonnaire (424), mais on ne note pas de différence sur le taux de grossesses cliniques (424).

e. Transfert d'embryons congelés

Seules 3 études ont évalué l'effet de la GH sur les résultats de transfert d'embryons congelés (TEC). Un ERC a été réalisé en 2019 chez 93 patientes tout-venant en FIV pour lesquels un endomètre fin (<7 mm) avait été observé lors de la FIV. La GH a été instaurée en même temps que le traitement hormonal substitutif (THS) pour la préparation endométriale. On observe une augmentation de l'épaisseur endométriale ainsi qu'une augmentation du taux de grossesses cliniques (426).

Une étude prospective contrôlée menée en 2016 sur 240 patientes compare l'effet de l'ajout de GH lors de TEC sous THS. Ils démontrent une augmentation de l'épaisseur endométriale, du taux de grossesses cliniques et de naissances vivantes (427).

Une étude rétrospective réalisée en 2019 évalue les résultats de 210 TEC si la GH a été instaurée comme traitement adjuvant de la FIV dont sont issus les embryons. On observe aussi une augmentation du taux de naissances vivantes (428).

La GH semble jouer un rôle dans la prolifération endométriale, cet effet serait moins visible en FIV du fait de l'hyperoestradiolémie liée à la stimulation ovarienne.

4. Recommandations de prescription en AMP

La prescription de GH en France en traitement adjuvant en FIV est hors AMM. En 2019, *l'European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) a publié des recommandations concernant la stimulation ovarienne et ses potentiels traitements adjuvants. L'utilisation de la GH a été évalué et démontre une augmentation du taux de naissances vivantes chez les mauvaises répondeuses. Cependant le niveau de preuve est trop limité pour émettre des recommandations systématiques en faveur du traitement adjuvant par GH : « *Use of adjuvant growth hormone before and/or during ovarian stimulation is probably not recommended for poor responders* » (429). En effet, on observe dans les différentes études incluses dans les méta-analyses une grande hétérogénéité de définition des critères des

mauvaises répondeuses et des schémas de traitement par GH ; par ailleurs les effets secondaires au long terme d'un traitement adjuvant par GH n'ont pas été étudiés.

Synthèse

- L'ajout de GH en traitement adjuvant pourrait améliorer les résultats en AMP :
 - Patientes normo-répondeuses : résultats contradictoires.
 - Patientes mauvaises répondeuses en FIV : amélioration des paramètres de la stimulation et biologiques, des taux de grossesses évolutives et de naissances vivantes.
 - Effet favorable sur l'implantation notamment sur l'épaisseur endométriale à la fois lors de transfert d'embryons frais ou d'embryons congelés.
- Les données concernant les corrélations entre les taux folliculaires ou sériques en GH et l'IGF1 sont variables. Globalement, les concentrations en GH et l'IGF1 semblent corrélées à certains paramètres des tentatives de FIV.

C. Vitamine D

1. Épidémiologie

Une méta-analyse menée en 2018 observe une prévalence élevée d'hypovitaminose D dans une population de femmes infertiles. On observe que 34,6% des patientes ont une 25(OH)D < 20 ng/ml et 45,3% entre 20 et 30 ng/ml. Au total, près de 80% des patientes infertiles suivies en AMP seraient carencées en vitamine D (430). La durée pour obtenir une grossesse spontanée n'est pas influencée par la carence en vitamine D (431).

L'effet d'un traitement par vitamine D a surtout été évalué chez de patientes SOPK en FIV ou hors traitement d'AMP. On ne voit pas de différence sur l'amélioration des cycles, mais une meilleure réponse à la stimulation avec un nombre de follicules dominants plus élevé (432).

Il a été démontré que la supplémentation en vitamine D réduit l'inflammation et le stress oxydatif dans le SOPK (433). Par ailleurs, on note une baisse significative du taux sérique de VEGF pouvant présumer un risque plus faible d'hyperstimulation ovarienne (434).

4 équipes ont évalué les effets métaboliques d'un traitement par vitamine D associée à du calcium. On observe aussi une augmentation du nombre de follicules dominants (435,436).

2. Impact d'une carence en vitamine D sur les résultats en AMP

De nombreuses études se sont intéressées à l'impact potentiel de la carence en vitamine D sur les résultats en AMP, cependant les résultats sont contrastés. Par ailleurs, il existe une variabilité de la sensibilité à l'action de la vitamine D en fonction de l'origine ethnique ce qui complexifie l'interprétation des résultats (437–439).

a. FIV

Plusieurs équipes ont évalué si les concentrations sériques ou folliculaires avaient une association avec les résultats en FIV. Les résultats sont synthétisés dans le tableau 5.

Concernant la carence en 25(OH)D déterminée par les taux sériques, on n'observe pas de différence sur les différents paramètres de la stimulation : nombre de jours de stimulation (122,440), dose totale de gonadotrophines (126,440,441), taux d'œstradiol au déclenchement (122,126,441) et l'épaisseur endométriale (122,441), le nombre total d'ovocytes recueillis (122,126,437,438,440–442) et taux de maturation ovocytaire (122,126,441,442). Les résultats sont plus discordants sur le taux de fécondation selon les taux de 25OHD: certains n'observent pas de différence (437,440,442), d'autres une corrélation positive (122,443,444) et une équipe observe une corrélation négative (126). L'impact sur l'embryon est variable aussi selon les équipes, 4 études ne mettent pas en évidence de différence sur la qualité embryonnaire (122,126,442,445), deux observent une amélioration de la qualité embryonnaire corrélée à la 25(OH)D (440,443) ainsi que du taux de clivage embryonnaire (443).

Plusieurs méta-analyses ont été réalisées pour évaluer l'impact de la concentration en 25(OH)D sur les issues de FIV. Une première méta-analyse réalisée en 2014 à partir de 3 études prospectives (n=353) ne démontre pas d'impact de la concentration en vitamine D sur les chances de grossesse en FIV (446). Deux méta-analyses en 2016 (5 études de cohorte, n= 1139) et 2018 (9 études cohortes, n=2254) ont montré chez les patientes carencées en vitamine D une diminution significative des naissances vivantes, mais sans diminution significative des taux de grossesses en FIV (447,448). Une autre méta-analyse de 2018 (11 études de cohorte, n=2700) a retrouvé une diminution significative des chances de grossesse et des taux de naissances vivantes. Il n'y avait pas de différence significative concernant les FCS ni concernant les grossesses issues de dons d'ovocytes (430). La dernière méta-analyse de Cozzolino de 2020

(14 études de cohorte, n=2712) ne mettait pas en évidence de différence en fonction des taux en 25(OH)D sérique sur les taux de grossesses, de FCS et de naissances vivantes (449).

Quelques équipes se sont intéressées à la **concentration folliculaire en 25(OH)D** et les résultats des tentatives de FIV.

Concernant les résultats de la FIV, on n'observe pas de corrélation entre la 25(OH)D folliculaire et le nombre total de gonadotrophines utilisées et de jours de stimulation (118), le nombre d'ovocytes recueillis (118,121), la maturation ovocytaire (121), le taux de blastulation (121) et la qualité embryonnaire (126). Une équipe observe une corrélation positive avec le taux de blastocystes euploïdes (121). À l'inverse, certains observent une corrélation négative entre la 25(OH)D folliculaire et le taux de fécondation (126) et la qualité embryonnaire à J3 (118,126).

Concernant les issues de tentative de FIV, une équipe observe une corrélation positive entre la 25(OH)D folliculaire et le taux de grossesses (116). 2 équipes ne démontrent pas de différence (115,123) et une équipe observe une corrélation négative avec les taux de grossesses et de naissances vivantes (126). Une autre étude démontre aussi une corrélation négative avec le taux de grossesses (118).

	25(OH)D sérique	25(OH)D folliculaire
Dosages hormonaux		
<i>E2 folliculaire</i>	nr	Positive (1)
<i>AMH folliculaire</i>	nr	Négative (1)
<i>Progestérone folliculaire</i>	nr	Positive (1)
<i>Testostérone folliculaire (libre et totale)</i>	nr	Négative (1)
Résultats des tentatives de FIV		
<i>Dose totale FSH</i>	NS (3)	NS (1)
<i>Durée stimulation</i>	NS (2)	NS (1)
<i>Taux E2 déclenchement</i>	NS (3)	NR
<i>Épaisseur endométriale</i>	NS (3)	NR
<i>Nombre d'ovocytes</i>	NS (7)	NS (2)
<i>Taux ovocytes matures</i>	NS (4)	NS (1)
<i>Taux fécondation</i>	Positive (3) - Négative (1) - NS (3)	Négative (1)
<i>Taux clivage embryonnaire</i>	Positive (1)	NR
<i>Taux développement embryonnaire</i>	nr	NS (1)
<i>Taux de FCS</i>	Positive (1) - NS (2)	NR
<i>Qualité embryonnaire</i>	Positive (2) - NS (4)	Négative (2) - Positive (1) - NS (1)
<i>Taux de grossesses</i>	Positive (1) - NS (4)	Négative (2) - Positive (1) - NS (2)
<i>Taux de naissances vivantes</i>	Positive (3) - NS (1)	Négative (1)

Tableau 5: Corrélation entre les taux sériques et folliculaires en 25(OH)D et les résultats des dosages hormonaux et des tentatives de FIV

(n) = nombre d'études, nr : non réalisé, NS : non significative, E2 : œstradiol, AMH : hormone antimüllérienne, FSH : gonadotrophines, FCS : fausse couche spontanée

b. Don d'ovocytes

Pour certains auteurs, l'impact de la vitamine D sur les résultats en FIV ne serait pas lié à l'amélioration de la qualité embryonnaire ni au statut euploïde de l'embryon, mais plutôt à la réceptivité de l'endomètre. Ainsi le modèle du don d'ovocytes a été proposé et certaines équipes ont évalué les résultats des tentatives de don d'ovocytes en fonction des concentrations sériques en 25(OH)D de la donneuse et de la receveuse. Concernant la concentration en 25(OH)D de la donneuse, on n'observe pas de différence sur le nombre de jours de stimulation, la dose totale de gonadotrophines, le nombre d'ovocytes récupérés et leur maturité, le taux de fécondation et le pourcentage d'embryons utilisables (450). 3 équipes ont évalué les issues des tentatives de don d'ovocytes en fonction de 25(OH)D sérique de la receveuse. On n'observe pas de différence sur l'épaisseur endométriale (450) et les taux de grossesses et le taux de grossesses évolutives (450,451). Une équipe observe une baisse significative des taux de grossesses chez les patientes carencées en vitamine D. L'hypothèse physiopathologique sous-jacente serait l'influence du calcitriol, produit par les cellules endométriales sur l'expression du gène HOX10A, gène critique de l'implantation (439).

c. TEC

Comme pour le don d'ovocytes, une équipe a utilisé le modèle des TEC pour évaluer l'effet endométrial de la vitamine D. Une étude prospective a été menée chez 280 patientes et a évalué les résultats de transfert de blastocystes vitrifiés en fonction de la 25(OH)D le jour du transfert embryonnaire. Il n'a pas été retrouvé de corrélation entre le taux de grossesses et la carence en vitamine D (445).

3. Ajout d'un traitement substitutif en vitamine D et résultats en AMP

Au vu de ces résultats discordants, des ERC ont été menés pour évaluer l'effet d'une supplémentation en vitamine D sur les résultats de tentatives d'AMP.

a. FIV

Les résultats de l'ERC SUNDRO ont été publiés en 2021 : cette étude randomisée, multicentrique, en double aveugle a été menée en Italie. Elle incluait 630 patientes suivies en FIV, ayant une 25(OH)D < 30ng/ml avec un groupe recevant 600 000 UI de vitamine D avant

de démarrer la prise en charge en FIV et l'autre non. On n'observe pas de différence entre les groupes sur la dose totale de gonadotrophines utilisées, le nombre d'ovocytes récupérés et matures, les taux de fécondation et taux d'embryons de bonne qualité supérieure. On ne note pas non plus de différence sur les issues de tentatives : taux de grossesses cliniques, de FCS et de naissances vivantes (452). Un second ERC publié en 2021 a évalué l'impact de l'ajout de la vitamine D en FIV à partir du déclenchement de l'ovulation chez 100 patientes. On observe une augmentation significative du taux d'implantation, mais pas du taux de grossesses évolutives (453).

b. TEC

En 2014, un ERC a évalué l'effet d'une substitution par vitamine D chez des patientes carencées avant TEC. 114 patientes ont été incluses. Aucune différence significative n'a été observée sur l'épaisseur endométriale et les taux de grossesses (454).

Synthèse :

- Les concentrations sériques et folliculaires en 25(OH)D ne semblent pas influencer les différents paramètres de la stimulation et le nombre d'ovocytes recueillis.
- Les résultats sont contradictoires concernant les paramètres biologiques et les issues de tentatives en FIV.
- Les modèles du DO et des TEC ne montrent pas d'influence de la 25(OH)D sur les chances de grossesse via la réceptivité endométriale.
- L'ajout d'un traitement par vitamine D ne semble pas modifier les chances de grossesse en TEC. Les résultats sont discordants en FIV.

Partie 2

À propos d'un cas : Amélioration de la qualité ovocytaire chez une patiente avec hypopituitarisme : étude du liquide folliculaire

Dans cette deuxième partie, nous présenterons le cas publié d'une patiente présentant un déficit en GH lié à un hypopituitarisme ayant bénéficié de 4 tentatives de FIV. Une substitution en GH a été instaurée avant sa dernière tentative de FIV permettant une amélioration de sa qualité ovocytaire et l'obtention d'une grossesse évolutive.

Résumé :

Contexte: L'hormone de croissance (GH) joue un rôle dans la folliculogénèse ovarienne et la maturation ovocytaire. Chez les patientes sans déficit en GH ayant une mauvaise réponse ovarienne, le traitement adjuvant par GH améliore les résultats en fécondation in vitro (FIV). Seules quelques observations chez des patientes avec déficit en GH ont été publiées. Nous en rapportons un nouveau cas avec étude du liquide folliculaire.

Méthodes: Une patiente de 29 ans hypopituitaire a été adressée dans notre centre d'assistance médicale à la procréation. Elle bénéficiait d'un traitement hormonal pour un hypogonadisme hypogonadotrope et un diabète insipide et ne souhaitait pas de traitement par GH. Quatre tentatives de FIV ont été réalisées entre 2011 et 2014. La substitution par GH (somatotropine 1.1 mg/jr) a été initiée avant la quatrième tentative; une hypothyroïdie centrale a été démasquée par le traitement par GH: la substitution par lévothyroxine (75 µg/jour) a été introduite. Les taux cibles d'IGF1 (insulin like growth factor 1), la T3L (triiodothyronine libre) et la T4L (thyroxine libre) ont été obtenus après 10 mois de substitution. Les taux de GH, d'IGF1 et d'hormones thyroïdiennes ont été mesurés dans le sang et le liquide folliculaire avant et après substitution par GH et hormones thyroïdiennes. La qualité ovocytaire et embryonnaire a aussi été comparée.

Résultats: Les 3 premières tentatives FIV ont été réalisées sans traitement par GH. 62% à 100% des ovocytes matures présentaient une ou plusieurs anomalies morphologiques: granularité cytoplasmique diffuse, augmentation de l'espace périvitellin avec présence de fragments, fragmentation du premier globule polaire, forme ovoïde de l'ovocyte ou décoronisation difficile. La qualité des embryons était intermédiaire à médiocre (grade B à D) et aucune grossesse n'a été obtenue après les transferts d'embryons. Après le traitement par GH, nous avons noté une augmentation des concentrations hormonales dans le liquide folliculaire : GH (7,68 vs 1,39 mUI/l), IGF1 (109 vs <25 ng/ml), T3L (3,7 vs 2,5 pmol/l) et T4L (1,45 vs 0,84 ng/ml). Parallèlement, nous avons observé une amélioration majeure de la qualité des ovocytes (aucun ovocyte avec anomalie morphologique) et des embryons (grade A), permettant un transfert d'embryon avec obtention d'une grossesse évolutive.

Conclusions: Il s'agit du premier cas objectivant les modifications hormonales dans le liquide folliculaire et l'effet bénéfique sur la qualité ovocytaire et embryonnaire d'une substitution par GH lors d'une tentative de FIV chez une patiente hypopituitaire. Ces résultats suggèrent qu'une substitution par GH améliore la qualité ovocytaire chez les patientes déficitaires en GH.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



Original article

Growth hormone replacement improved oocyte quality in a patient with hypopituitarism: A study of follicular fluid

Amélioration de la qualité ovocytaire par substitution d'hormone de croissance chez une patiente avec hypopituitarisme: étude du liquide folliculaire

Florence Scheffler^{a,b,*}, Rosalie Cabry^{a,b}, Marion Soyez^c, Henri Copin^a, Moncef Ben Khalifa^{a,b}, Aviva Devaux^{a,b}, Rachel Desailoud^{d,b}

^a Reproductive Medicine and Biology Department, Cytogenetics and CECOS of Picardy, Amiens University Hospital, Picardy, France

^b Peritox UMR_I 01, CURS, Jules Verne University of Picardy, Amiens, France

^c Endocrine and Bone Biology Department, Amiens University Hospital, Picardy, France

^d Endocrinology, Diabetes, and Nutrition Department, Amiens University Hospital, Picardy, France

ARTICLE INFO

Keywords:

In-vitro fertilization (IVF)
Hypopituitarism
Growth hormone deficiency (GHD)
Growth hormone (GH) replacement
Oocyte quality

ABSTRACT

Background. – Growth hormone (GH) is known to be involved in ovarian folliculogenesis and oocyte maturation. In patients with poor ovarian response without growth hormone deficiency (GHD), adjuvant GH treatment improves in-vitro fertilization (IVF) results. Improvement of oocyte quality in IVF by GH replacement was reported in only a few patients with GHD. We report on a new case with study of follicular fluid.

Methods. – A 29-year-old patient with hypopituitarism was referred to our infertility center. She was undergoing hormonal replacement for hypogonadotropic hypogonadism and diabetes insipidus, and did not consider at first GH replacement. Four IVF procedures were performed between 2011 and 2014. Growth hormone replacement (somatotropin 1.1 mg/day) was initiated before the fourth IVF procedure and unmasked central hypothyroidism; levothyroxine (75 mg/day) was introduced. It took 10 months to reach the treatment objectives for insulin-like growth factor 1 (IGF1), free triiodothyronine (fT3) and free thyroxine (fT4). GH, IGF1 and thyroid hormones were measured in the blood and follicular fluid before and after GH and thyroid hormone replacement. Oocyte and embryo quality were also compared.

Results. – The first 3 IVF procedures were performed without GH replacement. 62% to 100% of mature oocytes presented one or more morphologic abnormalities: diffuse cytoplasmic granularity, large perivitelline space with fragments, fragmentation of the first polar body, ovoid shape, or difficult denudation. Embryo quality was moderate to poor (grade B to D), and no pregnancy was obtained after embryo transfer. After GH replacement, hormones levels increased in follicular fluid: GH [7.68 vs. 1.39 mIU/L], IGF1 [109 vs. <25 ng/mL], fT3 [3.7 vs. 2.5 pmol/L] and fT4 [1.45 vs. 0.84 ng/mL]. Concomitantly, there was dramatic improvement in oocyte quality (no abnormal morphologies) and embryo quality (grade A), allowing an embryo transfer with successful pregnancy.

* Corresponding author at: Médecine et Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et CECOS de Picardie, Centre de biologie humaine, CHU Amiens Picardie, site sud, 30, avenue de la Croix Jourdain, 80000 Amiens, France.

E-mail addresses: scheffler.florence@chu-amiens.fr (F. Scheffler), cabry.rosalie@chu-amiens.fr (R. Cabry), soyez.marion@chu-amiens.fr (M. Soyez), copin.henri@chu-amiens.fr (H. Copin), benkhalifa.moncef@chu-amiens.fr (M. Ben Khalifa), devaux.aviva@chu-amiens.fr (A. Devaux), desailoud.rachel@chu-amiens.fr (R. Desailoud).

<https://doi.org/10.1016/j.ando.2021.05.003>

0003-4266/© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Please cite this article as: Scheffler F, et al, Growth hormone replacement improved oocyte quality in a patient with hypopituitarism: A study of follicular fluid, Ann Endocrinol (Paris), <https://doi.org/10.1016/j.ando.2021.05.003>

Conclusions. – This is the first report illustrating changes in hormonal levels in follicular fluid and the beneficial effect of GH replacement on oocyte and embryo quality during an IVF procedure in a patient with hypopituitarism. These results suggest that GH replacement is beneficial for oocyte quality in patients with GHD.

© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

R É S U M É

Mots clés :

Fécondation in vitro (FIV)
Hypopituitarisme
Déficit en hormone de croissance (GH)
Substitution par GH
Qualité ovocytaire

Contexte. – L'hormone de croissance (GH) joue un rôle dans la folliculogénèse ovarienne et la maturation ovocytaire. Chez les patientes sans déficit en GH ayant une mauvaise réponse ovarienne, le traitement adjuvant par GH améliore les résultats en fécondation in vitro (FIV). Seules quelques évaluations de la qualité ovocytaire chez des candidates à la FIV avec déficit en GH ont été publiées. Nous en rapportons un nouveau cas avec étude du liquide folliculaire.

Méthodes. – Une patiente de 29 ans hypopituitaire a été adressée dans notre centre d'assistance médicale à la procréation. Elle bénéficiait d'un traitement hormonal pour un hypogonadisme hypogonadotrope et un diabète insipide et ne souhaitait pas de traitement par GH. Quatre tentatives de FIV ont été réalisées entre 2011 et 2014. La substitution par GH (somatotropine 1,1 mg/jr) a été initiée avant la quatrième tentative. Une hypothyroïdie centrale a été démasquée par le traitement par GH: la substitution par lévothyroxine (75 mg/jour) a été introduite. Les taux cibles d'IGF1 (insulin-like growth factor 1), la T3L (triiodothyronine libre) et la T4L (thyroxine libre) ont été obtenus après 10 mois de substitution. Les taux de GH, d'IGF1 et d'hormones thyroïdiennes ont été mesurés dans le sang et le liquide folliculaire avant et après substitution par GH et hormones thyroïdiennes. La qualité ovocytaire et embryonnaire a aussi été comparée.

Résultats. – Les 3 premières tentatives FIV ont été réalisées sans traitement par GH. 62 % à 100 % des ovocytes matures présentaient une ou plusieurs anomalies morphologiques: granularité cytoplasmique diffuse, augmentation de l'espace périvitellin avec présence de fragments, fragmentation du premier globule polaire, forme ovoïde de l'ovocyte ou décoronisation difficile. La qualité des embryons était intermédiaire à médiocre (grade B à D) et aucune grossesse n'a été obtenue après les transferts d'embryons. Après le traitement par GH, nous avons noté une augmentation des concentrations hormonales dans le liquide folliculaire: GH (7,68 vs 1,39 mUI/L), IGF1 (109 vs <25 ng/mL), FT3 (3,7 vs 2,5 pmol/L) and FT4 (1,45 vs 0,84 ng/mL). Parallèlement, nous avons observé une amélioration majeure de la qualité des ovocytes (aucun ovocyte avec anomalie morphologique) et des embryons (grade A), permettant un transfert d'embryon avec obtention d'une grossesse évolutive.

Conclusions. – Il s'agit du premier cas objectivant les modifications hormonales dans le liquide folliculaire et l'effet bénéfique sur la qualité ovocytaire et embryonnaire d'une substitution par GH lors d'une tentative de FIV chez une patiente hypopituitaire. Ces résultats suggèrent qu'une substitution par GH améliore la qualité ovocytaire chez les patientes déficitaires en GH.

© 2021 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

1. Introduction

Many factors are involved in in vitro fertilization (IVF) outcomes, and oocyte and embryo quality are critical issues. Pituitary hormones other than gonadotropin are known to be involved in folliculogenesis and oocyte maturation. Growth hormone (GH) and gonadotropic cycles are closely related throughout life, starting with the regulation of the onset of puberty. Studies have shown that GH and IGF1 (insulin-like growth factor) stimulate the hypothalamo-gonadotropic cycles at all levels. GH influences the release of gonadotropins. GH also has both direct and IGF1-mediated effects on the ovary, including estradiol production by granulosa cells and oocyte maturation [1,2]. Few studies report the beneficial effect of GH replacement on ovarian stimulation in women with GH deficiency (GHD) [3–6]. Improvement of oocyte quality in IVF was reported only in one patient with isolated GHD in 2018 [7]. The present work is, to our knowledge, the first case illustrating that an increase in GH/IGF1 in follicular fluid (FF) under GH replacement is associated with normalization of abnormal oocytes and improvement of embryonic quality during an IVF procedure in a patient with hypopituitarism.

2. Materials and methods

We report the case of a 29-year-old woman referred to our infertility center for treatment of acquired infertility due to

hypogonadotropic hypogonadism. The approval by an ethical committee was not required for a case-report but informed consent has been obtained for the publication of the case report and accompanying images. She developed hypopituitarism (hypogonadotropic hypogonadism, GHD, and diabetes insipidus) following radiotherapy and chemotherapy for a brain dysgerminoma diagnosed when she was 15 years old. At the time of the treatment, she had primary amenorrhea, and puberty was induced by estrogen replacement therapy. When referred to our center, she was being treated with desmopressin (Minirin®, Ferring, France), an estrogen/progesterone-based hormone replacement therapy (Provames®, Merus Labs Luxco, Luxembourg, and Utrogestan®, Besins, France), and vitamin D supplementation (Uvedose®, Crinex, France). She did not want GH replacement because she was worried about a possible relapse of her brain dysgerminoma.

When first evaluated for infertility treatment, hormonal assays showed hypogonadotropic hypogonadism with follicle stimulating hormone (FSH) 5.4 mIU/mL (N: 3.4-12), luteinizing hormone (LH) 3 mIU/mL (N: 3-18.6), estradiol (E2) 8 pg/mL (N: 25-100), anti-Müllerian hormone (AMH) 8.1 ng/mL (N: 2-6), inhibin-B 23 pg/mL (N: 45-340). She had no hyperandrogenism total testosterone 0.59 ng/mL (N:0.1-0.6), testosterone binding protein (TeBG) 96 nmol/L (N: 18-83), dehydroepiandrosterone sulfate (SDHEA) 2064 ng/mL (N:333-3 333). Thyroid function was normal. A pelvic ultrasound revealed a normal uterus. The ovaries were multifollicular, concordant with the AMH value. The hysteroscopy

showed a normal uterine cavity. Her husband was 29 years old with a history of an inguinal hernia treated at 10 years old without cryptorchidism. He presented moderate oligoasthenoteratozoospermia (OATS): volume; 4.6 mL (N: 1.5-6), sperm concentration; $11.4 \times 10.6/\text{mL}$ (N: 15-200), progressive motility: 30% (N > 32%), normal forms; 3% (N > 15%) without any abnormality in his exams (karyotype, testicular ultrasound, and hormonal testing). This idiopathic OATS led us to favor an IVF procedure.

3. Results

The four IVF procedures are shown in detail in Table 1. For all of these procedures, when at least three follicles had reached a diameter ≥ 17 mm, a dose of 250 μg of recombinant human chorionic gonadotropin-rhCG (Ovitrelle[®], Merck, France) was administered and oocyte retrieval was performed 35 h after hCG administration. The four IVF procedures were performed by intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI). The endometrial thickness was optimal before all embryo transfers (between 7.5 mm and 8.5 mm). The first IVF was performed with an antagonist protocol, as is usually done in cases of multifollicular ovaries, to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. Nine mature oocytes of 12 collected presented an abnormal granular cytoplasm. Denuding was difficult for 4 oocytes. The embryonic quality (for a day 2 or 3 embryo) was assessed by a score (Istanbul consensus): a grade A embryo was the one with the best implantation potential and a grade D the most unfavorable [8]. For the blastocysts' evaluation, the Gardner classification was used: developmental score from 1-6 based on their degree of expansion of the blastocyst (6 defining the most mature); scores from A to C to assess the development of the inner cell mass and scores from A to C for the trophectoderm (score A defining the most optimal quality) [9]. One of 8 embryos obtained was transferred at day 3 (Grade B). No pregnancy resulted. To improve oocyte quality, the second IVF was performed with a long agonist protocol. Twenty-three oocytes were collected, of which 18 were mature. Once again, 15 oocytes presented abnormalities: 9 of 18 mature oocytes had an abnormal granular cytoplasm, 11 had a fragmented first polar body (1PB), 3 were ovoid, 2 had a large perivitelline space with fragments, and 2 resisted denuding. Eight oocytes presented a single anomaly, 6 had double anomalies, and 2 had triple anomalies or more. Twelve embryos were obtained at day 3. None of them were transferred. They were put back into culture because of the poor embryonic quality. One embryo was transferred at day 5 and was of medium quality (B4ba) and 2 were frozen. No pregnancy resulted. For the transfer of the frozen embryos, we performed 2 cycles of GnRH agonist (Décapeptyl[®], Ipsen Pharma, France) and estradiol/progestin (Provames[®] 6 mg, Merus Labs Luxco, Luxembourg and, Utrogestan[®] 600 mg, Besins, France). For the first cycle, a B5bb embryo was transferred and a B4cc was transferred for the second cycle. There was still no pregnancy. The third IVF was performed with a long agonist protocol for which she had had an optimal ovarian response. Since we suspected a negative role of GHD, hormone levels were determined in the blood and FF (Table 2). Once again, 4 of 8 mature oocytes had an abnormal granular cytoplasm, 2 had a fragmented 1PB, and 1 had a large perivitelline space with fragments. Oocytes are shown in Figure 1. Seven embryos were obtained at day 3. None were transferred but were put back into extended culture because of the poor embryo quality (5 grade C and 2 grade D). No blastocyst was obtained at day 5.

Given that the literature had described ovulation induction and IVF success after GH replacement, we proposed, for the second time, introducing GH replacement before starting a new IVF. As commonly described, a central hypothyroidism was unmasked by the GH replacement, so we introduced levothyroxine. Therapeutic objectives were to achieve free thyroxine (fT4) levels near the upper

normal range and normal free triiodothyronine (fT3) levels, resulting in an IGF1 near the median value of the normal range. It took 10 months to reach the treatment objectives for IGF1, usual time to achieve treatment goals [10]; 262 ng/mL (N: 103-391, median 205), fT4; 16.1 g/mL (N: 9.3-17), fT3; 3.6 pg/mL (N: 2-4.43). The patient's treatment was 1.1 mg/day somatotropin (Norditropine[®] Simplex, Novo Nordisk, France) and levothyroxine 75 mcg/day (Lévothyrox[®], Merck Serono, France).

The fourth IVF was then performed with a short agonist protocol. Five of 8 collected oocytes were mature. None of the oocytes presented anomalies as seen for the previous IVF procedures (Fig. 1). Five embryos were obtained at day 3 and one was transferred (Grade A). Two other embryos were frozen at day 3 (Grade A and B).

Hormone levels were determined again in the blood and FF. Blood and FF assays of GH, IGF1, and thyroid hormones were performed the day of oocyte retrieval by immunoassay (Immulite 2000, Siemens Health Care Diagnostic, UK). IGF1 was not detectable in FF before GH replacement. We observed that GH/IGF1 concentrations were increased in blood and FF with GH replacement. fT4 and fT3 levels were increased in follicular fluid, in favor of a partial central hypothyroidism although blood levels were still normal. The absence of thyroid autoimmunity was confirmed. Data on hormone levels are described in Table 2.

Pregnancy was achieved. GH replacement was stopped once the pregnancy was diagnosed. At gestational week 37, she gave birth to a healthy girl weighing 2 500 g without obstetrical or neonatal complications.

4. Discussion

This case report illustrates the positive effect of GH replacement on IVF outcomes in a patient with acquired hypopituitarism. Initially, our patient did not want GH replacement. There is currently no consensus on the initiation of GH replacement in an adult population with hypopituitarism as there is for standard replacement therapy of glucocorticoids, thyroid hormones, or sex steroids. To date, no study has investigated the effect of GH replacement in patients with hypopituitarism who need IVF. However, GH replacement has previously been shown to improve ovulation induction in GHD and IVF success in poor responders [3,11]. After 3 IVF failures, our patient decided to undergo the advised GH replacement therapy. A central hypothyroidism was then unmasked; this hormonal interaction is well-known [12]. Levothyroxine was then introduced, and we took care to reach the recommended treatment objectives [13], as the fetal outcome is critical. Moreover, thyroid hormones are important in folliculogenesis [14].

Data on women with hypopituitarism are scarce. Effects of GH replacement on ovulation induction in GHD patients were reported in the 1980s [4]. Pregnancy and live birth rates after ovulation induction have been reported in 19 patients: 7 patients received GH replacement and no differences were observed. However, GHD status and treatment objectives were not specified [15]. Improvement in ovulation induction was reported later for 3 women with GHD [3,5,6]. Because IVF is rarely necessary in patients with GHD, only two case reports have demonstrated the impact of GH replacement on IVF results. The first described a positive effect on the endometrium in a failed IVF implantation in a woman with hypopituitarism (GH replacement improved the endometrial thickness resulting in a live birth, no data on oocyte quality were reported) [16]. The second study observed the improvement of oocyte quality during IVF in a patient with isolated GHD such as we observed in our patient. They found normalization of oocyte dysmorphism, including that of granular cytoplasm [7].

Table 1
 In vitro fecundation (IVF) characteristics.

	1st IVF 12/2011	2nd IVF 06/2012	3rd IVF 04/2013	4th IVF 07/2014
Ovarian Stimulation Protocol	Antagonist: Cetrotide® Menopur® 225 IU Ovitrelle®	Long agonist: Decapeptyl® Menopur® 112.5 IU Ovitrelle®	Long agonist: Decapeptyl® Menopur® 100 IU Ovitrelle®	Short agonist: Decapeptyl® Menopur® 100IU Ovitrelle®
Ovulation trigger				
Total oocytes (n)	12	23	12	8
Mature oocytes (n/%)	9 (75%)	18 (78%)	8 (66%)	5 (62.5%)
Abnormal oocytes (n/%)	9 (100%)	15 (83%)	5 (62%)	0
With 1 anomaly	5 (55%)	8 (44%)	2 (25%)	
With 2 anomalies	4 (45%)	6 (33%)	2 (25%)	
With 3 anomalies	0	2 (11%)	1 (12.5%)	
Type of anomalies				
Granular oocytes	9	9	4	
Wide perivitelline space	0	2	0	
Ovoid shape	0	3	1	
Difficult denudation	4	2	0	
Fragmented first polar body	0	11	2	
Fertilization rate (%)	88	66.6	87.5	100
Total embryos, Day 3 (n)	8	12	7	5
Grade ^a A/B/C/D	0/1/3/5	0/2/5/5	0/0/5/2	2/3/0/0
Extended culture	No	Yes	Yes	Yes
Blastocysts (n)	0	3	0	2
Frozen embryo (n)	0	2	0	2
Transferred embryos			0	
Day 3	1 (Grade B)			1 (Grade A)
Day 5 ^b		1 (B4ba)		
Transfer of frozen embryos (day 5)	0	1 (B5bb)	0	0
		1 (B4cc)		
Pregnancy	No	No		Yes

Ovitrelle®: choriogonadotropin alpha; Menopur® 225 IU Menotropin, FSH and LH activity; Cetrotide®: cetrorelix; Decapeptyl®: triptoreline.

^a Istanbul consensus.

^b Gardner classification.

Table 2
 Hormonal and antithyroid antibody levels in blood and follicular fluids (FF).

Fluid	Before IVF procedure		During the 3rd IVF Before GH replacement 2013		During the 4th IVF with GH and L-thyroxine replacement 2014	
	Blood		Blood 13:00 h	FF 09:00 h	Blood 13:00 h	FF 09:00 h
GH (< 15 mIU/L)			1.39	1.39	2.95	7.68
IGF1 (108-247; median 193 ng/mL)	< 25		< 25	< 25	153	109
TSH (0.4-4 mIU/L)	1.59		2.71	1.6	0.16	0.12
ft4 (0.75-1.45 ng/dL)	0.87		0.78	0.84	1.28	1.45
ft3 (3.4-6,1 pmol/L)	4.42		3.1	2.5	3.8	3.7
anti-TPO Ab (<60)			53.8	< 30	< 28	< 30
anti-Tg Ab (< 30)			< 30	< 30	< 30	

Abbreviations: Ab: antibody, IVF: in vitro fecundation, GH: Growth hormone, IGF1: Insulin-like growth factor, TSH: thyroid stimulated hormone, ft3: Free triiodothyronine, ft4: Free thyroxine, TPO: thyroperoxidase, TG: thyroglobulin.



Fig. 1. Meta II oocyte quality before (A and B) and after GH treatment (C): (A) Diffuse cytoplasmic granularity, large perivitelline space with fragments, and fragmented first polar body. (B) Diffuse cytoplasmic granularity and fragmented first polar body. (C) Normal oocyte.

Having a priori knowledge of possible effects of GH, we measured GH, IGF1, and thyroid hormones in blood and follicular fluid during the 3rd and 4th IVF procedures, i.e., before and after GH replacement. We observed that GH concentrations increased in follicular fluid, demonstrating the passive and/or active passage of blood into follicular fluid. IGF1 levels rose as well, demonstrating the passage and/or effects of GH on IGF1 local synthesis. GH adjuvant treatment in IVF is also associated with increased concentrations of GH and IGF1 in FF in patients without GHD [17]. Two prospective studies in patients without GHD have shown that a higher FF GH concentration is associated with better fertilization and pregnancy rates [18,19]. Abir et al. have shown that GH and GH-receptor (GH-R) are expressed in human ovarian stromal cells, oocytes, and granulosa cells early in folliculogenesis [20]. GH exerts both direct and IGF1-mediated effects on the ovary. GH is involved in the development of primordial to preovulatory human follicles by playing a role in the initiation of growth and survival. GH is also implicated in granulosa and theca cell differentiation, gonadotropin-dependent steroidogenesis, oocyte maturation, and expansion of the cumulus cells [21,22]. Ovarian cells express IGF-receptor I/II (IGFR) [23]. Systemic and/or local IGF1 stimulates proliferation and activity of granulosa cells and their response to gonadotropins. In addition, IGF1 is implicated in the regulation of follicular development and sex-steroid production [22]. IGF1 mRNA has been detected in human granulosa cells and in different animal models [22], so local IGF1 secretion could also be stimulated by GH replacement in GHD patients.

GH mechanisms improving ovulation are not well understood, but a synergistic effect has been described with gonadotropin. In ovarian stimulation in patients without GHD, GH adjuvant treatment has reduced the duration and dose of gonadotropin in ovulation induction and IVF [24,25]. Mean E2 levels were significantly increased on the day of hCG administration [25]. FF E2 concentrations were also raised after GH adjuvant treatment, and correlated with FF GH concentration [17,18,21]. Regan et al. demonstrated that GH adjuvant treatment increased the gonadotropin and GH receptor density in granulosa cells, which can improve gonadotropin response [26].

The role of thyroid hormones has to be discussed since it has been shown that TSH and thyroid hormones are detected in human FF [27] and their receptors are detected in granulosa cells and oocytes [28]. Thyroid hormones play a role in folliculogenesis. FT3 improves granulosa cell proliferation [14] and inhibits granulosa cell apoptosis [29]. Thyroid hormones participate in steroidogenesis by increasing estradiol and progesterone secretion by granulosa cells [30]. Moreover, it has been demonstrated that untreated subclinical hypothyroidism is associated with adverse reproductive outcomes after IVF, such as increased miscarriage and low delivery rate [31]. Supplementation of subclinical hypothyroidism by levothyroxine (LT4) increases embryonic quality, pregnancy, and delivery rates and decreases miscarriage [32]. However, no study has evaluated the impact of hypothyroidism on oocyte quality. Thyroid hormone levels in our patient were not optimal during the first 3 IVF procedures. Since central hypothyroidism was unmasked by GH replacement, we believe that levothyroxine replacement should have been initiated before the upper normal range of FT4 was reached. However, FT4 was within the normal range, which is why we conclude that GH effects were predominant in the improvement of oocyte quality.

The ICSI technique through egg denudation is helpful in assessing oocyte quality prior to fertilization. With hormonal replacement, the oocyte quality of our patient dramatically improved. Oocyte abnormalities, such as an abnormal granular cytoplasm, were no longer present. Moreover, we observed an improvement in embryonic quality, allowing an embryo transfer resulting in a successful pregnancy. No prospective study has

evaluated oocyte and embryo quality and/or the impact of GH replacement on IVF outcomes in patients with hypopituitarism. For our patient, 62% and 100% of mature oocytes presented abnormal morphology: diffuse cytoplasmic granularity, large perivitelline space with fragments, ovoid shape, difficult denuding, and 1BP fragmentation, which is higher compared to typical patients. In the literature, 10 to 50% of oocytes present dysmorphism after IVF stimulation [33]. Overall, morphological variations in the oocyte may result from intrinsic factors such as age and genetic defects, or extrinsic factors such as stimulation protocols, culture conditions, and nutrition. For the third and fourth IVF attempts, we used agonist protocols with the same type and dose of gonadotropin as well as the same conditions of embryo culture. We can then assume that it is GH replacement that improved oocyte and embryo quality in terms of biological changes in follicular fluids and the positive outcome. Many studies have evaluated the impact of oocyte dysmorphism in IVF results, but it is still debatable due to study design and variability in the characterization criteria. It has been shown that oocytes with abnormal granular cytoplasm have lower fertility rates and poorer embryo quality [34]. Decreased survival and impaired in vitro development after cryopreservation of embryos deriving from oocytes with central granulation have been reported [35]. Cellular mechanisms leading to granular cytoplasm are not known; however, mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum abnormalities are suspected [33,34].

In addition to GH replacement, GH adjuvant treatment has been proposed to improve IVF outcomes in patients without GHD. Many studies have assessed the impact of GH adjuvant treatment on IVF success rates in poor responders. Four meta-analyses and a Cochrane review have evaluated the benefits of GH therapy during ovarian stimulation. It has been shown that GH administration significantly improved pregnancy and live birth rates by increasing the number of oocytes collected, but no effects were described on oocyte and embryo quality [36–40]. In normo-ovulatory patients, the effect of GH adjuvant treatment is still being debated. A Cochrane review and prospective studies did not observe a significant difference in the number of oocytes collected or pregnancy and live birth rates [38,41,42], whereas one recent randomized controlled trial (RCT) and retrospective studies have demonstrated beneficial effects on live birth rate [26,43]. In patients with multiple IVF failures, two prospective controlled studies and one retrospective study found that GH therapy significantly improved the number of oocytes collected and the pregnancy and live birth rates [44–46]. Considering our results and those found in the literature, we assume that the GH/IGF1 system plays a role in repairing oocyte abnormalities.

The role of oocyte modification on a successful IVF outcome and pregnancy could be challenged by the GH endometrial effect. Few studies have evaluated the impact of GH adjuvant treatment on endometrial function. One RCT and one prospective controlled study in patients without GHD evaluated frozen-thawed embryo transfer with hormone-replacement therapy for endometrial preparation. They observed that endometrial thickness as well as pregnancy and live birth rates were significantly higher with GH adjuvant treatment. GH could also improve clinical outcomes after IVF by increasing endometrial blood perfusion and expression of cytokines related to endometrial receptivity [47,48]. In our patient, endometrial thickness and appearance were normal before all embryo transfers. Thus, we can assume that this mechanism was not implicated.

GH replacement was discontinued at the time of pregnancy diagnosis. Our patient gave birth at 37 gestational weeks without obstetrical or neonatal complications. While isolated cases of GH deficiency do not seem to have more obstetrical complications than normal patients [49], pregnancy in patients with GH deficiency and hypopituitarism, particularly in cases of childhood-onset

deficiencies, seem to have a higher obstetric risk. Retrospective studies have observed a higher risk of miscarriage, transverse lie, caesarian section, birth weight under the 10th centile, and very poor obstetrical outcomes for twin pregnancies [15,50,51]. In patients with hypopituitarism, thus IVF double embryo transfers must not be performed so that twin pregnancies can be avoided. The debate over whether or not to continue GH treatment during pregnancy is not over. A large retrospective study compared the obstetrical outcomes in 3 groups of 173 women with hypopituitarism. The groups consisted of patients without GH treatment, with GH replacement until the end of the second trimester, and with GH treatment throughout the entire pregnancy. The live birth rate, the gestational week at delivery, the birth weight, and the obstetric outcomes were the same in the 3 groups [51]. During pregnancy, placental GH secretion increases throughout pregnancy, with a peak at 36 gestational weeks. Placental GH has a stronger affinity for GH receptors than pituitary GH, so it replaces maternal GH which becomes undetectable in the serum after 24 weeks, so placental GH controls maternal IGF1 levels [52]. Placental GH control of fetal growth and intra-uterine growth retardation has been observed in patients with low placental GH levels [53]. Since a similar rise in placental GH and IGF-1 is present in women with GHD, this seems sufficient for a normal pregnancy and healthy fetus [54]. The Endocrine Society recommends discontinuing GH replacement during pregnancy because of the lack of evidence for an additional benefit [51,55].

5. Conclusions

In patients with hypopituitarism wishing a pregnancy, GH replacement may be part of the preparation for optimal folliculogenesis. In clinical practice, endocrinologists and gynecologists should work together in the management of appropriate hormonal replacement during ovulation induction and/or IVF in these patients. Research on oocyte quality needs to be conducted. Animal models could be useful for explaining GH and thyroid hormone effects on oocyte quality, growth, and maturation in culture.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

- [1] Chandrashekar V, Zaczek D, Bartke A. The consequences of altered somatotrophic system on reproduction. *Biol Reprod* 2004;71:17–27, <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.103.027060>.
- [2] Karamouti M, Kollia P, Kallitsaris A, Vamvakopoulos N, Kollios G, Messinis IE. Growth hormone, insulin-like growth factor I, and leptin interaction in human cultured lutein granulosa cells steroidogenesis. *Fertil Steril* 2008;90:1444–50, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.08.076>.
- [3] Daniel A, Ezzat S, Greenblatt E. Adjuvant growth hormone for ovulation induction with gonadotropins in the treatment of a woman with hypopituitarism. *Case Rep Endocrinol* 2012;2012:356429, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/356429>.
- [4] Blumenfeld Z, Lunenfeld B. The potentiating effect of growth hormone on follicle stimulation with human menopausal gonadotropin in a panhypopituitary patient. *Fertil Steril* 1989;52:328–31, [http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)60864-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282(16)60864-6).
- [5] Salle A, Klein M, Pascal-Vigneron V, Dousse B, Leclere J, Weryha G. Successful pregnancy and birth after sequential cotreatment with growth hormone and gonadotropins in a woman with panhypopituitarism: a new treatment protocol. *Fertil Steril* 2000;74:1248–50.
- [6] Park JK, Murphy AA, Bordeaux BL, Dominguez CE, Session DR. Ovulation induction in a poor responder with panhypopituitarism: a case report and review of the literature. *Gynecol Endocrinol* 2007;23:82–6, <http://dx.doi.org/10.1080/09513590601137533>.
- [7] Albu D, Albu A. Is growth hormone administration essential for in vitro fertilization treatment of female patients with growth hormone deficiency? *Syst Biol Reprod Med* 2019;65:71–4, <http://dx.doi.org/10.1080/19396368.2018.1492044>.
- [8] Alpha Scientists in Reproductive Medicine., ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011;26:1270–83, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/der037>.
- [9] Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999;11:307–11, <http://dx.doi.org/10.1097/00001703-199906000-00013>.
- [10] Borson-Chazot F, Chabre O, Salenave S, Klein M, Brac de la Perriere A, Reznik Y, et al. Adherence to growth hormone therapy guidelines in a real-world French cohort of adult patients with growth hormone deficiency. *Ann Endocrinol* 2021;82:59–68, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ando.2020.11.007>.
- [11] Bergh C, Hillensjö T, Wikland M, Nilsson L, Borg G, Hamberger L. Adjuvant growth hormone treatment during in vitro fertilization: a randomized, placebo-controlled study. *Fertil Steril* 1994;62:113–20.
- [12] Agha A, Walker D, Perry L, Drake WM, Chew SL, Jenkins PJ, et al. Unmasking of central hypothyroidism following growth hormone replacement in adult hypopituitary patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:72–7, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02688.x>.
- [13] Alexander EK, Pearce EN, Brent GA, Brown RS, Chen H, Dosiou C, et al. 2017 Guidelines of the American Thyroid Association for the Diagnosis and Management of Thyroid Disease During Pregnancy and the Postpartum. *Thyroid* 2017;27:315–89, <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2016.0457>.
- [14] Goldman S, Dirnfeld M, Abramovici H, Kraiem Z, Triiodothyronine and follicle-stimulating hormone, alone and additively together, stimulate production of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in cultured human luteinized granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1869–73.
- [15] Hall R, Manski-Nankervis J, Goni N, Davies MC, Conway GS. Fertility outcomes in women with hypopituitarism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:71–4, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02550.x>.
- [16] Drakopoulos P, Pluchino N, Bischof P, Cantero P, Meyer P, Chardonens D. Effect of Growth Hormone on Endometrial Thickness and Fertility Outcome in the Treatment of Women with Panhypopituitarism: A Case Report. *J Reprod Med* 2016;61:78–82.
- [17] Hughes SM, Huang ZH, Matson PL, Buck P, Lieberman BA, Morris ID. Clinical and endocrinological changes in women following ovulation induction using buserelin acetate/human menopausal gonadotrophin augmented with biosynthetic human growth hormone. *Hum Reprod* 1992;7:770–5, <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137735>.
- [18] Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega A, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, et al. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod* 2002;17:1017–22.
- [19] Mendoza C, Cremades N, Ruiz-Requena E, Martinez F, Ortega E, Bernabeu S, et al. Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. *Hum Reprod* 1999;14:628–35.
- [20] Abir R, Garor R, Felz C, Nitke S, Krissi H, Fisch B. Growth hormone and its receptor in human ovaries from fetuses and adults. *Fertil Steril* 2008;90:1333–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.08.011>.
- [21] Bergh C, Carlström K, Selleskog U, Hillensjö T. Effect of growth hormone on follicular fluid androgen levels in patients treated with gonadotropins before in vitro fertilization. *Eur J Endocrinol* 1996;134:190–6.
- [22] Silva JRV, Figueiredo JR, van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology* 2009;71:1193–208, <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.015>.
- [23] Qu J, Godin PA, Nisolle M, Donnez J. Expression of receptors for insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta in human follicles. *Mol Hum Reprod* 2000;6:137–45.
- [24] Homburg R, Eshel A, Abdalla HI, Jacobs HS. Growth hormone facilitates ovulation induction by gonadotrophins. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1988;29:113–7, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.1988.tb00252.x>.
- [25] Dakhly DMR, Bassiouny YA, Bayoumi YA, Hassan MA, Gouda HM, Hassan AA. The addition of growth hormone adjuvant therapy to the long down regulation protocol in poor responders undergoing in vitro fertilization: Randomized control trial. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2018;228:161–5, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.06.035>.
- [26] Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, Arfuso F, Dharmarajan A. Growth hormone during in vitro fertilization in older women modulates the density of receptors in granulosa cells, with improved pregnancy outcomes. *Fertil Steril* 2018;110:1298–310, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.08.018>.
- [27] Wakim AN, Polizzotto SL, Buffo MJ, Marrero MA, Burholt DR. Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertil Steril* 1993;59:1187–90.
- [28] Aghajanova L, Lindeberg M, Carlsson IB, Stavreus-Evers A, Zhang P, Scott JE, et al. Receptors for thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2009;18:337–47.
- [29] Verga Falzacappa C, Mangialardo C, Patriarca V, Bucci B, Amendola D, Raffa S, et al. Thyroid hormones induce cell proliferation and survival in ovarian granulosa cells COV434. *J Cell Physiol* 2009;221:242–53, <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.21849>.
- [30] Wakim AN, Polizzotto SL, Burholt DR. Augmentation by thyroxine of human granulosa cell gonadotrophin-induced steroidogenesis. *Hum Reprod* 1995;10:2845–8.
- [31] Scoccia B, Demir H, Kang Y, Fierro MA, Winston NJ. In vitro fertilization pregnancy rates in levothyroxine-treated women with hypothyroidism compared to women without thyroid dysfunction disorders. *Thyroid* 2012;22:631–6, <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2011.0343>.

- [32] Kim C-H, Ahn J-W, Kang SP, Kim S-H, Chae H-D, Kang B-M. Effect of levothyroxine treatment on in vitro fertilization and pregnancy outcome in infertile women with subclinical hypothyroidism undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2011;95:1650–4, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.12.004>.
- [33] Sousa M, Cunha M, Silva J, Oliveira E, Pinho MJ, Almeida C, et al. Ultrastructural and cytogenetic analyses of mature human oocyte dysmorphisms with respect to clinical outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2016;33:1041–57, <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-016-0739-8>.
- [34] Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Hum Reprod Update* 2011;17:34–45, <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmq029>.
- [35] Balaban B, Ata B, Isiklar A, Yakin K, Urman B. Severe cytoplasmic abnormalities of the oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos. *Hum Reprod* 2008;23:1778–85, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/den127>.
- [36] Hart RJ. Use of Growth Hormone in the IVF Treatment of Women With Poor Ovarian Reserve. *Front Endocrinol* 2019;10, <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2019.00500>.
- [37] Li X-L, Wang L, Lv F, Huang X-M, Wang L-P, Pan Y, et al. The influence of different growth hormone addition protocols to poor ovarian responders on clinical outcomes in controlled ovary stimulation cycles: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2017;96:e6443, <http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000006443>.
- [38] Harper K, Proctor M, Hughes E. Growth hormone for in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev* 2003, <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD000099> [CD000099].
- [39] Yu X, Ruan J, He L-P, Hu W, Xu Q, Tang J, et al. Efficacy of growth hormone supplementation with gonadotrophins in vitro fertilization for poor ovarian responders: an updated meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:4954–67.
- [40] Hart RJ, Rombauts L, Norman RJ. Growth hormone in IVF cycles: any hope? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2017;29:119–25, <http://dx.doi.org/10.1097/GCO.0000000000000360>.
- [41] Shaker AG, Fleming R, Jamieson ME, Yates RW, Coutts JR. Absence of effect of adjuvant growth hormone therapy on follicular responses to exogenous gonadotropins in women: normal and poor responders. *Fertil Steril* 1992;58:919–23, [http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)55435-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282(16)55435-1).
- [42] Younis JS, Simon A, Koren R, Dorembus D, Schenker JG, Laufer N. The effect of growth hormone supplementation on in vitro fertilization outcome: a prospective randomized placebo-controlled double-blind study. *Fertil Steril* 1992;58:575–80, [http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)55266-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282(16)55266-2).
- [43] Chu K, Pang W, Sun N, Zhang Q, Li W. Outcomes of poor responders following growth hormone co-treatment with IVF/ICSI mild stimulation protocol: a retrospective cohort study. *Arch Gynecol Obstet* 2018;297:1317–21, <http://dx.doi.org/10.1007/s00404-018-4725-5>.
- [44] Hazout A, Junca A, De Mouzon J, Cohen-Bacrie P. Effect of growth hormone on oocyte competence in patients with multiple IVF failures. *Reprod Biomed Online* 2009;18:664–70, [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60011-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60011-9).
- [45] Chen Y, Liu F, Nong Y, Ruan J, Guo Q, Luo M, et al. Clinical efficacy and mechanism of growth hormone action in patients experiencing repeat implantation failure. *Can J Physiol Pharmacol* 2018;96:929–32, <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2017-0786>.
- [46] Shirlow R, Healey M, Volovsky M, MacLachlan V, Vollenhoven B. The Effects of Adjuvant Therapies on Embryo Transfer Success. *J Reprod Infertil* 2017;18:368–78.
- [47] Cui N, Li A-M, Luo Z-Y, Zhao Z-M, Xu Y-M, Zhang J, et al. Effects of growth hormone on pregnancy rates of patients with thin endometrium. *J Endocrinol Invest* 2019;42:27–35, <http://dx.doi.org/10.1007/s40618-018-0877-1>.
- [48] Xue-Mei W, Hong J, Wen-Xiang Z, Yang L. The effects of growth hormone on clinical outcomes after frozen-thawed embryo transfer. *Int J Gynaecol Obstet* 2016;133:347–50, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.10.020>.
- [49] Sakai S, Wakasugi T, Yagi K, Ohnishi A, Ito N, Takeda Y, et al. Successful pregnancy and delivery in a patient with adult GH deficiency: role of GH replacement therapy. *Endocr J* 2011;58:65–8.
- [50] Overton CE, Davis CJ, West C, Davies MC, Conway GS. High risk pregnancies in hypopituitary women. *Hum Reprod* 2002;17:1464–7, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/17.6.1464>.
- [51] Vila G, Akerblad A-C, Mattsson AF, Riedl M, Webb SM, Hana V, et al. Pregnancy outcomes in women with growth hormone deficiency. *Fertil Steril* 2015;104:1210–7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.07.1132> [e1].
- [52] Lønberg U, Damm P, Andersson A-M, Main KM, Chellakooty M, Lauenborg J, et al. Increase in maternal placental growth hormone during pregnancy and disappearance during parturition in normal and growth hormone-deficient pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:247–51, <http://dx.doi.org/10.1067/mob.2003.82>.
- [53] Vila G, Luger A. Growth hormone deficiency and pregnancy: any role for substitution? *Minerva Endocrinol* 2018;43:451–7, <http://dx.doi.org/10.23736/S0391-1977.18.02834-1>.
- [54] Verhaeghe J, Bougoussa M, Van Herck E, de Zegher F, Hennen G, Igout A. Placental growth hormone and IGF-I in a pregnant woman with Pit-1 deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;53:645–7.
- [55] Fleseriu M, Hashim IA, Karavitaki N, Melmed S, Murad MH, Salvatori R, et al. Hormonal Replacement in Hypopituitarism in Adults: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:3888–921, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2016-2118>.

Partie 3

Description de la population et de l'étude

I. Objectifs

Les objectifs de ce travail de thèse étaient : - de déterminer les concentrations des hormones de l'axe thyroïdienne, somatotrope et de la vitamine D dans le LF, ainsi que la présence d'ACAT; - et d'analyser les associations de ces données avec les différents paramètres de fécondation in vitro (FIV).

Devant l'absence d'étude retrouvée dans la littérature sur l'influence de ces hormones et des ACAT sur la qualité ovocytaire, nous avons centré une partie de nos analyses sur cette thématique.

Pour ce faire 3 analyses ont été réalisées :

- Analyse 1 : Étude des concentrations hormonales en TSH, T3L, T4L, GH, IGF1, 25(OH)D et des anticorps-TPO et anti-TG, dans le sérum et les liquides folliculaires issus de FIV +/- ICSI,
- Analyse 2 : Études de l'association entre la qualité des ovocytes issus d'ICSI et ces différentes concentrations hormonales et la présence d'ACAT,
- Analyse 3 : Études d'une association entre les issues de tentatives de FIV +/- ICSI et ces différentes concentrations et la présence d'ACAT.

II. Sélection des couples

Cette étude est un projet ancillaire du programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) « *tabafertimasc* », obtenu après accord du Comité de Protection des Personnes émis le 16 octobre 2012 (Référence PHRC IR09, ID RCB : 2011-A00634-37, Amiens).

Elle a été menée de façon prospective entre le 1^{er} janvier 2013 et le 31 décembre 2017 dans le service de médecine et biologie de la reproduction, CECOS de Picardie, du centre hospitalier universitaire (CHU) d'Amiens-Picardie.

Les critères d'inclusion des patients dans l'étude étaient :

- Couples en cours de protocole de FIV avec ou sans ICSI,
- Femmes ayant moins de 36 ans, euthyroïdiennes avant la tentative,
- Hommes ayant moins de 46 ans, avec une numération spermatique supérieure ou égale à 5 millions de spermatozoïdes au moment de la tentative,
- Première ou seconde demande,
- Première ou seconde tentative,
- Toutes indications confondues (tubaire, troubles ovulatoires, cervicale, endométriose, masculine ou idiopathique).

La participation à l'étude a pu être proposée aux couples à différents moments de leur prise en charge : lors de la consultation de remise des ordonnances du protocole de stimulation pour la tentative de FIV et/ou ICSI, lors des échographies de suivi de stimulation de l'ovulation ou le jour de la ponction ovocytaire. Les informations sur le cadre légal et les objectifs de l'étude, les modalités de participation ainsi que les prélèvements nécessaires (prélèvements de LF et prélèvements sanguins) leur étaient communiqués à cette occasion. Les consentements libres et éclairés (annexes 2 et 3) ont été signés en présence d'un médecin du service au moment de l'inclusion du couple et il leur a été remis une fiche d'information (annexes 4 et 5).

Les patientes ont pu bénéficier d'un des deux protocoles de stimulation ovarienne : agoniste long ou antagoniste. Le protocole de stimulation et la dose de FSH administrée ont été choisis par le médecin suivant le couple en fonction des antécédents médicaux de la patiente et de l'évaluation de sa réserve ovarienne. Ces protocoles sont détaillés dans l'annexe 6.

Les procédures pour le tri ovocytaire, la technique de décoronisation, la FIV et/ou ICSI, la culture embryonnaire et le transfert embryonnaire sont celles utilisées classiquement dans le laboratoire de biologie de la reproduction et sont décrites dans les annexes 7 et 8.

III. Flow chart de l'étude

Le design de l'étude globale est présenté dans la figure 2. Nous présenterons tout d'abord un descriptif de notre population globale et des tentatives de FIV+/- ICSI. Puis nous décrirons les 3 analyses qui ont été réalisées sur cette population :

- Analyse 1 : Étude des concentrations hormonales en TSH, T3L, T4L, GH, IGF1, 25(OH)D et des anticorps-TPO et anti-TG, dans le sérum et les liquides folliculaires issus de FIV +/- ICSI,
- Analyse 2 : Études de l'association entre la qualité des ovocytes issus d'ICSI et ces différentes concentrations hormonales et la présence d'ACAT,
- Analyse 3 : Études d'une association entre les issues de tentatives de FIV+/- ICSI et ces différentes concentrations et la présence d'ACAT.

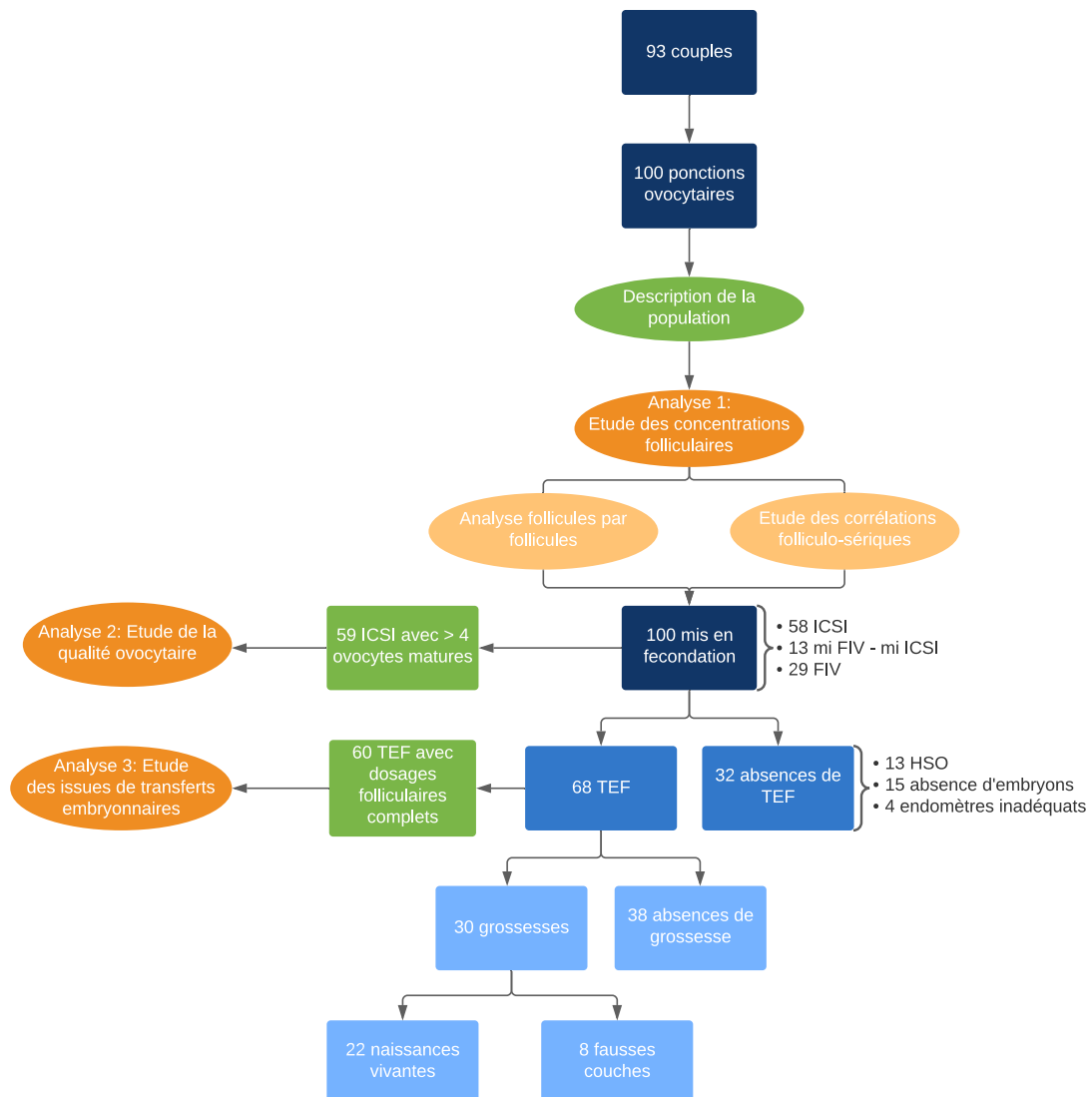


Figure 2: Flow chart de l'étude

IV. Analyses statistiques

Les critères biologiques de conférence de consensus Vienne (455) ont été utilisés pour la comparaison des groupes :

- Taux de fécondation en FIV : nombre d'ovocytes avec 2 pronuclei (PN)-2GP / nombre de CCO inséminés x100
- Taux de fécondation en ICSI : nombre d'ovocytes 2PN-2GP / nombre de CCO micro-injectés x100
- Taux de développement embryonnaire à J2 : nombre d'embryons à 4 cellules à J2 / nombre d'ovocytes fécondés x100
- Taux de développement embryonnaire à J3 : nombre d'embryons à 8 cellules à J3 / nombre d'ovocytes fécondés x100

Les autres critères évalués ont été :

- Le taux d'ovocytes matures en ICSI: nombre d'ovocytes avec 1GP / nombre d'ovocytes recueillis à la ponction x100
- Taux d'ovocytes anormaux (ICSI) : nombre d'ovocytes présentant au moins une anomalie morphologique / nombre d'ovocytes avec 1 GP x100
- Taux de transfert : nombre de tentatives pour lesquelles un transfert embryonnaire frais a eu lieu / nombre total de ponctions ovocytaires x100
- Taux de congélation : nombre de tentatives pour lesquelles une congélation embryonnaire a eu lieu / nombre total de ponctions ovocytaires x100
- Taux de grossesses : nombre de tentatives avec hCG > 100 UI/l / nombre de tentatives avec transfert embryonnaire x100
- Taux de naissances vivantes : nombre de naissances vivantes / nombre de tentatives avec transfert embryonnaire x100

Les analyses statistiques ont été réalisées avec l'aide des statisticiens du CHU d'Amiens ou avec le logiciel *pvalue.io* (456). Les données sont exprimées en médiane (quartiles), ou en moyenne (extrêmes) ou en pourcentage. Les corrélations entre 2 variables quantitatives ont été étudiées avec le coefficient de corrélation de Spearman. Pour la comparaison de 2 échantillons indépendants, un test du Chi² ou un test de Fisher exact a été utilisé pour les variables qualitatives ; un test de Mann-Whitney pour les variables quantitatives. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative. L'analyse multivariée des données n'a pas pu être réalisée du fait d'effectifs insuffisants.

V. Description de la population et des tentatives de FIV+/- ICSI

93 patientes ont été incluses dans l'étude pour lesquelles 100 tentatives de FIV +/- ICSI ont été réalisées entre le 23/01/2013 et le 24/11/2017. Différents paramètres ont été évalués : la moyenne d'âge, la consommation ou non de tabac et l'indice de masse corporelle (IMC). Chez les femmes, la FSH en début de cycle, l'AMH et la notion d'antécédents gynécologiques ont été recherchées. 5 patientes présentaient une hypothyroïdie substituée. Chez les hommes, la notion d'antécédents uro-génitaux, les paramètres spermatiques initiaux et le jour de la ponction ovocytaire ont été relevés. Ces données sont réunies dans les tableaux 6 et 7.

Femmes (n=93)	
Âge (années)	30 (28-33)
Tabac	18%
IMC	22,5 (20-26)
FSH J2/J3 (mUI/l)	6,5 (4,9-7,55)
AMH (ng/mL)	3,43 (2,2-6,9)
TSH avant FIV (mUI/l)	1,65 (1,23-2,19)
Antécédents gynécologiques :	
<i>Altération tubaire</i>	34,4%
<i>Endométriose</i>	18 %
<i>SOPK</i>	25,8 %
<i>BRO</i>	12,9 %
Hypothyroïdie substituée	5,4 %

Tableau 6: Caractéristiques de la population féminine

Les résultats sont exprimés en médiane (Q25-75) ou pourcentage

IMC : Indice de masse corporelle ; FSH : Hormone folliculostimulante ; AMH : Hormone antimüllérienne ; SOPK : Syndrome des ovaires polykystiques ; BRO : Baisse de réserve ovarienne ;

Hommes (n=93)	
Âge (années)	32 (30-36)
Tabac	39,8 %
IMC	24 (22,5-26)
Antécédents urogénitaux	13,9 %

Tableau 7: Paramètres de la population masculine

Les résultats sont exprimés en médiane (Q25-75) ou pourcentage. IMC : indice de masse corporelle

33 couples (35,5%) présentaient une infertilité secondaire. La durée moyenne d'infertilité était de 3,9 ans. 34 couples (36,6%) réalisèrent ces tentatives de FIV+/- ICSI après des échecs d'inséminations intra-utérines. La répartition des indications de prise en charge est présentée dans la figure 3.

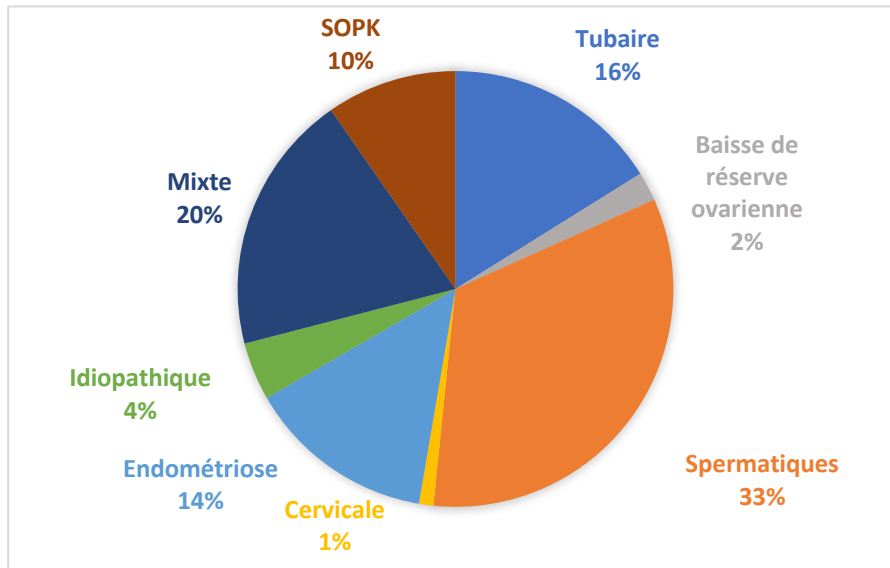


Figure 3: Répartition des indications de prise en charge en FIV+/- ICSI
SOPK : Syndrome des ovaires polykystiques

100 stimulations ont été réalisées, pour chaque tentative de stimulation, une mise en fécondation des ovocytes et des spermatozoïdes a pu être réalisée, réparties en 58 ICSI, 29 FIV et 13 mi-FIV mi-ICSI. Le taux de transfert était de 68% et le taux de congélation de 43%. Le taux de grossesses par transfert était de 44,1% et le taux de naissances vivantes par transfert de 32,4%. Les issues de tentatives sont présentées dans la figure 2. Les paramètres des stimulations ovariennes, spermatozoaires, ovocytaires et embryonnaires sont résumés dans le tableau 8.

Paramètres des stimulations ovariennes	
Nombre total d'unités de FSH utilisée (UI)	1800 (1350-2550)
Durée de stimulation (jours)	12 (10,8-13)
Taux d'oestradiol au déclenchement (pg/ml)	1991 (1449-2765)
Épaisseur endométriale (mm)	10,4 (9,2-12)
Paramètres spermatiques	
Volume spermatique (ml)	3,7 (2,5-5)
Numération spermatique (millions/ml)	56 (19-92,5)
Formes typiques (David modifiée)	22,9% (0-83)
Mobilité spermatique (%):	
- Totale	45 (35-55)
- Type a+b	40 (30-50)
Paramètres ovocytaires	
Nb moyen d'ovocytes ponctionnés	11,5 (8-16)
% d'ovocytes matures	73,7% (61,1-83,3)
% d'ovocytes avec 1 anomalie morphologique	42,9% (25,4-60)
% d'ovocytes avec 2 anomalies morphologiques	7,7% (0-25)
Paramètres embryonnaires	
Taux de fécondation	75% (60-85,7)
Taux de développement embryonnaire à J2	66,7% (33,3-88,9)
Issues de tentatives	
Taux de transfert par ponction	68%
Taux de congélation par ponction	43%
Taux de grossesses par transfert embryonnaire	44,1%
Taux de naissances vivantes par transfert embryonnaire	32,4%

Tableau 8: Paramètres des stimulations ovariennes, paramètres spermatiques, ovocytaires et embryonnaires et issues des tentatives de FIV+/- ICSI
Les résultats sont exprimés en médiane (Q25-75) ou pourcentage. FSH : gonadotrophines

Partie 4

Analyse 1 : Études des concentrations folliculaires

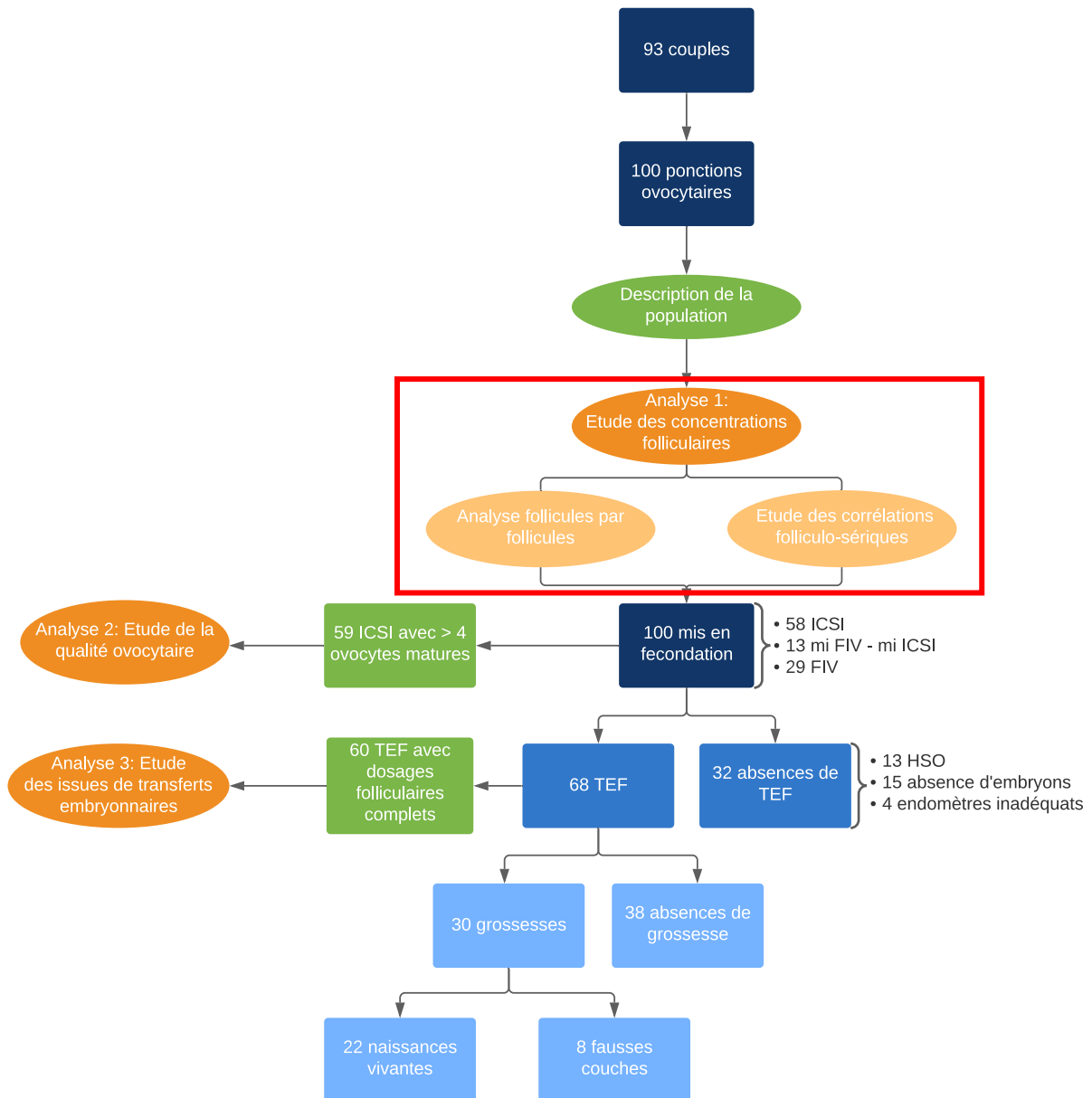


Figure 2: Flow chart de l'étude

I. Objectif

L'objectif de cette première analyse était de déterminer les concentrations hormonales folliculaires en TSH, T3L, T4L, GH, IGF1, 25(OH)D et ainsi que la présence des anticorps anti TPO et anti-TG.

Nous avons tout d'abord évalué si nous pouvions pooler les LF d'une même patiente pour l'analyse de ces concentrations. Nous avons donc recherché si des différences de concentrations étaient observées en fonction des différents follicules pour une même patiente.

Puis nous avons analysé l'ensemble des LF et sérums afin de chercher une corrélation entre les concentrations sériques et folliculaires pour ces différentes hormones et les ACAT.

II. Matériel et méthodes

A. Recueil des liquides folliculaires

La ponction ovocytaire écho-guidée a été effectuée au bloc opératoire sous anesthésie générale. Deux techniques de prélèvement ovocytaire ont été réalisées : une première où la ponction folliculaire était réalisée follicule par follicule et une deuxième où l'ensemble des liquides folliculaires était poolés au fur et à mesure de la ponction dans des seringues.

Pour la première technique dite « individualisée », pour l'un des deux ovaires, chaque follicule ovarien était mesuré. Pour ceux ayant un diamètre supérieur ou égale à 17 mm, chaque follicule a été aspiré séparément dans une seringue. Le diamètre du follicule et le numéro de la seringue ont été consignés afin de pouvoir établir un suivi lors du tri ovocytaire et de la culture embryonnaire. L'ovaire controlatéral a été ponctionné par la technique dite « poolée ». Cette technique « individualisée » n'a été réalisée que si le nombre de formations matures sur l'ovaire était supérieur ou égal à 4 et que la technique de mise en fécondation prévue était l'ICSI.

Pour la deuxième technique dite « poolée » classique, les liquides folliculaires issus des follicules matures ont été aspirés dans des seringues de 10 ml jusqu'au remplissage de la seringue.

Les techniques de tri ovocytaire et de décoronisation pour la technique « poolée » sont celles utilisées classiquement dans le laboratoire de biologie de la reproduction et sont décrites dans l'annexe 7. Celles pour la technique « individualisée » sont décrites dans l'annexe 9.

B. Technique de préparation des liquides folliculaires

Les LF obtenus lors de la ponction ovocytaire ont été replacés dans leur seringue initiale après le tri ovocytaire et mis dans une étuve à 37°C, ceux contaminés par du sang ont été exclus de l'étude. Ils ont été transvasés dans des tubes de 50 ml (figure 4) pour centrifugation à 2000 RPM pendant 10 minutes afin de séparer le LF des différentes cellules (cellules de la granulosa, éléments figurés du sang). Le surnageant a été récupéré (figure 5) et placé dans deux tubes anonymisés de 5 mL dans un congélateur à - 20°C pour conservation avant analyse finale (figure 6).



Figure 4: Liquides folliculaires avant centrifugation

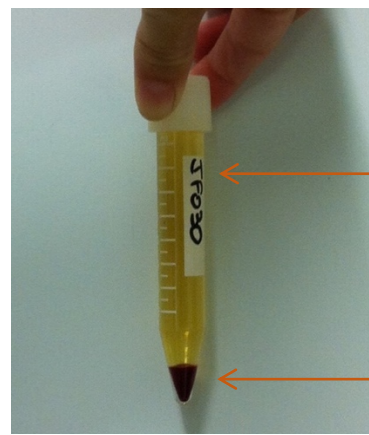


Figure 5: Liquide folliculaire après centrifugation

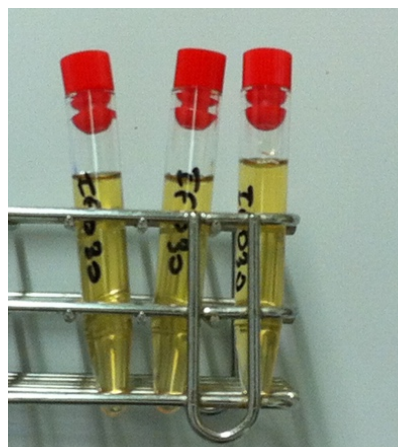


Figure 6: Tubes anonymisés avant congélation

C. Dosage des hormones et des anticorps antithyroïdiens dans le sérum et les liquides folliculaires ovariens

1. Chronologie des analyses

Les prélèvements et analyses sanguines ont été effectués le jour même de la ponction ovocytaire. 3 tubes secs ont ainsi été prélevés. Un tube sec de 6 ml fut transmis au laboratoire de biologie endocrinienne et osseuse du CHU d'Amiens. Un second tube sec de 6 ml fut transmis au laboratoire de médecine nucléaire situé à l'hôpital sud du CHU d'Amiens. Un troisième tube sec de 6 ml fut congelé à -20°C en cas de problème technique sur un des 2 précédents tubes.

Les analyses des LF ont été réalisées toutes en même temps à la fin de l'étude : un tube de 5 ml fut transmis au laboratoire de biologie endocrinienne et osseuse et un tube de 5 ml fut transmis au laboratoire de médecine nucléaire.

L'analyse de la GH, de l'IGF1 et de la 25(OH)D ayant été rajoutée au protocole initial, il n'y a pas eu de matériel biologique (sérum et/ou LF) suffisant pour faire ces dosages chez toutes les patientes.

2. Techniques de dosages et normes sériques

Le même kit de dosage des hormones TSH, T3L, T4L, GH, IGF1, 25(OH)D et la recherche d'ACAT a été utilisé pour le sérum et les LF. Les analyses suivantes ont été réalisées pour chaque hormone, suivies de leur norme dans le sérum:

- TSH: chimiluminescence, automate VISTA 500TM (SIEMENS); N: 0,4-4 mUI/l
- T3L: chimiluminescence, automate VISTA 500TM (SIEMENS); N: 3,4-6,1 pmol/l
- T4L: chimiluminescence, automate VISTA 500TM (SIEMENS); N: 0,75-1,45 ng/dl
- Anticorps anti-TPO: chimiluminescence, automate CENTAUR XPTM (SIEMENS);
N : < 28 UI/ml
- Anticorps anti-TG: immunoradiométrique (IRMA) (kit Immunotech®, Beckman Coulter,), N : < 30 UI/ml
- 25(OH)D : chimiluminescence, automate CENTAUR XPTM (SIEMENS); N : 30-80
ng/ml
- GH: chimiluminescence, automate IMMULITE 2000XPi (SIEMENS) ; N : < 15 mUI/l
- IGF1: chimiluminescence, automate IMMULITE 2000XPi (SIEMENS)

Pour l'IGF1, la norme s'exprime en médiane (Q5-Q95) en fonction de l'âge. Dans notre cohorte les patientes étaient dans les tranches d'âge 21-24 ans et 25-39 ans (tableau 9).

Age	5ème percentile	Médiane	95ème percentile
16 - 20 ans	268	352	471
21 - 24 ans	149	239	332
25 - 39 ans	108	193	247
40 - 54 ans	93	160	245
> 55 ans	54	152	204

Tableau 9: Normes de l'IGF1 chez la femme en fonction de l'âge

Les techniques réalisées pour les analyses des concentrations hormonales et des ACAT ont été validées pour l'analyse du sérum, il n'y a pas de validation biologique pour la technique dans le LF.

III. Résultats

A. Analyse follicules par follicules

Afin d'évaluer la reproductibilité des dosages hormonaux entre follicules, nous avons prélevé 3 patientes par la technique dite « individualisée ». La maturité ovocytaire des follicules prélevés semblait comparable les uns aux autres.

Devant le faible nombre de prélèvements, nous n'avons pas pu réaliser d'analyses statistiques comparatives, uniquement des analyses descriptives. Pour chaque hormone, nous avons calculé la médiane et les extrêmes, la moyenne et l'écart-type et le coefficient de variation des taux folliculaires. Ces résultats sont présentés pour chaque patiente dans le tableau 10. Nous présentons par la suite les résultats pour chaque patiente.

On observe que les coefficients de variation pour chaque hormone sont assez proches de ceux établis par le laboratoire. Lorsque l'on regarde les valeurs brutes, les variations observées ont peu de pertinence significative sur le plan clinique.

	Patiante 1 (n= 5 LF)	Patiante 2 (n=6 LF)	Patiante 3 (n=4 LF)
TSH (mUI/l): <i>CV laboratoire intra-essai : 1,87%</i> - Sérique - LF : - Médiane (Extrême) - Moyenne (Écart-type) - CV	2,36 2,18 (2,08-2,36) 2,19 (0,11) / 5%	1,82 1,18 (1,08-1,29) 1,175 (0,08) 6,8%	12,1 8,18 (8,04-8,46) 8,22 (0,2) 2,4%
T3L (pmol/l): <i>CV laboratoire intra-essai : 2,78%</i> - Sérique - LF : - Médiane (Extrême) - Moyenne (Écart-type) - CV	5,7 4,49 (4,29-4,65) 4,42 (0,16) 3,6%	4,4 3,58 (3,49-3,74) 3,58 (0,12) 3,4%	3,9 3,3 (3,12-3,35) 3,27 (0,11) 3,4%
T4L (ng/dl): <i>CV laboratoire intra-essai : 1,36%</i> - Sérique - LF : - Médiane (Extrême) - Moyenne (Écart-type) - CV	0,88 1 (0,96-1,04) 1,004 (0,03) 3%	1,1 1,06 (1,01-1,17) 1,065 (0,06) 5,6%	1,08 1,47 (1,46-1,49) 1,47 (0,02) 1,4%
GH (mUI/l): <i>CV laboratoire intra-essai : 3,06%</i> - Sérique - LF : - Médiane (Extrême) - Moyenne (Écart-type) - CV	nr	nr	8,85 5,145 (5,04-5,43) 5,19 (0,18) 3,5%
IGF1 (ng/ml): <i>CV laboratoire intra-essai : 3,98%</i> - Sérique - LF : - Médiane (Extrême) - Moyenne (Écart-type) - CV	nr	nr	249 112,5 (106-117) 112 (4,55) 4%
Vitamine D (ng/ml): <i>CV laboratoire intra-essai : 9,79%</i> - Sérique - LF : - Médiane (Extrême) - Moyenne (Écart-type) - CV	nr	nr	8,7 11,56 (10,37-13,47) 11,75 (1,31) 11,1%

Tableau 10: Médiane et extrêmes, moyennes et écart-types et CV des dosages folliculaires par patiente.

LF : liquide folliculaire, CV : coefficient de variation, nr : non réalisé

La patiente 1 était âgée de 35 ans, elle ne présentait pas d'antécédents médico-chirurgicaux particuliers. Son bilan thyroïdien avant FIV ne montrait pas d'anomalie. 5 follicules ont été prélevés par la technique individualisée. La patiente a eu une grossesse évolutive à la suite de cette tentative de FIV. Les résultats sont présentés dans le tableau 11.

Numéro seringue	1	2	3	4	5	Taux sérique
Taille follicule (mm)	19	22	21	21	18,5	-
Nombre CCO	1	1	1	1	-	-
Qualité après décoronisation	GP+	0	GP+	GP+	-	-
J1	2PN/2GP	-	2PN/2GP	2PN/2GP	-	-
J2	4.2.2 / C+	-	4.2.1 / B-	4.1.1 / A-	-	-
J3	5.2.2 / D	-	7.2.1 / B*	4.2.2 / C	-	-
J5	Arrêt évolution	-	-	Arrêt évolution	-	-
TSH (N: 0,4-4 mUI/l)	2,08	2,37	2,18	2,18	2,18	2,36
T3L (N :3,4-6,1 pmol/l)	4,27	4,65	4,39	4,29	4,49	5,7
T4L (N: 0,75-1,45 ng/dl)	0,96	1	1	1,04	1,02	0,88
Anticorps anti-TPO (N: < 28 UI/ml)	38,4	46,7	36,4	53,5	55,2	44,2
Anticorps anti-TG (N: < 30 UI/ml)	0	0	0	0	0	0

Tableau 11: Patiente 1 : Résultats de la tentative d'ICSI, des dosages folliculaires et sériques des hormones et ACAT pour les LF prélevés par technique individualisée
CCO : Complexe cumulo-ovocytaire, GP+ : Présence de globule polaire, PN : Pronuclei,
A, B, C, D : Score de qualité embryonnaire, N= norme sérique, * Embryon transféré

La patiente 2 était âgée de 27 ans, elle ne présentait pas d'antécédents médico-chirurgicaux particuliers. Son bilan thyroïdien avant FIV ne montrait pas d'anomalie. 6 follicules ont été prélevés par la technique individualisée. La patiente a eu une grossesse évolutive suite à cette tentative de FIV. Les résultats sont présentés dans le tableau 12.

Numéro seringue	1	2	3	4	5	6	Taux sérique
Taille follicule (mm)	27	17	19	29	25	30	-
Nombre CCO	1	1	0	1	1	1	-
Qualité après décoronisation	PV	GP+	-	GP+	GP+	GP+	-
J1	-	2PN/2GP	-	1PN	0PN	2PN/2GP	-
J2	-	4.1.1/A- *	-	-	-	2.2.1 / C-	-
J3	-		-	-	-	7.2.1 / B	-
J5	-		-	-	-	Début compaction	-
J6	-		-	-	-	Arrêt évolution	-
TSH (N: 0,4-4 mUI/l)	1,1	1,29	1,17	1,19	1,22	1,08	1,82
T3L (N :3,4-6,1 pmol/l)	3,51	3,51	3,74	3,49	3,56	3,69	4,4
T4L (N: 0,75-1,45 ng/dl)	1,05	1,17	1,02	1,07	1,07	1,01	1,1
Anticorps anti TPO (N: < 28 UI/ml)	<28	55,2	33,33	40,8	51,4	<28	80,8
Anticorps anti TG (N: < 30 UI/ml)	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 12: Patiente 2 : Résultats de la tentative d'ICSI, des dosages folliculaires et sériques des hormones et ACAT pour les LF prélevés par technique individualisée
CCO : Complexe cumulo-ovocytaire, PV : Pellucide vide, GP+ : Présence de globule polaire, PN : Pronucléus, A, B, C, D : Score de qualité embryonnaire, N= norme sérique * Embryon transféré

La patiente 3 était âgée de 35 ans, elle présentait une hypothyroïdie substituée par lévothyroxine. 4 follicules ont été prélevés par la technique individualisée. Il a été découvert une TSH élevée (12,1mUI/l) au cours de la tentative de FIV. Il a donc été décidé de ne pas réaliser de transfert d'embryons frais. Devant l'absence de développement embryonnaire, aucune congélation n'a pu être réalisée. Les LF n'ont pas été en quantité suffisante pour réaliser les dosages des anticorps antithyroïdiens. Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

Numéro seringue	1	2	3	4	Taux sérique
Taille follicule (mm)	21	22,5	21	22	-
Nombre CCO	1	0	2	1	-
Qualité après décoronisation	GP+	-	GP+ et GP+	GP+	-
J1	2PN/2GP	-	2PN/2GP 2PN/2GP	2PN/2GP	-
J2	-	-	-	-	-
TSH (N: 0,4-4 mUI/l)	8,04	8,46	8,3	8,06	12,1
T3L (N :3,4-6,1 pmol/l)	3,12	3,262	3,337	3,356	3,9
T4L (N: 0,75-1,45 ng/dl)	1,462	1,497	1,478	1,461	1,08
Anticorps anti TPO (N: < 28 UI/ml)	nr	nr	nr	nr	1249
Anticorps anti TG (N: < 30 UI/ml)	nr	nr	nr	nr	33
GH (N :<15mUI/l)	5,07	5,22	5,04	5,43	8,85
IGF1 (N :108-247 ng/ml)	106	112	113	117	249
Vitamine D (N : 30-80 ng/ml)	11,23	13,47	10,37	11,92	8,7

Tableau 13: Patiente 3 : Résultats de la tentative d'ICSI, des dosages folliculaires et sériques des hormones et ACAT pour les LF prélevés par technique individualisée
CCO : Complexe cumulo-ovocyttaire, GP+ : Présence de globule polaire, PN : Pronucléus, N= norme sérique

Synthèse :

- Les hormones TSH, T3L, T4L, GH, IGF1 et 25(OH)D sont détectées dans les LF.
- Le coefficient de variation entre chaque follicule pour chaque hormone est proche de celui du laboratoire et les valeurs brutes sont concordantes sur le plan clinique.
- Cette première analyse nous permet de valider la technique du pooling des LF pour la suite de la cohorte.

B. Analyse des corrélations folliculo-sériques

1. Axe thyroïdien

Les hormones thyroïdiennes TSH, T3L et T4L ont été détectées dans les LF tout comme les anticorps anti-TPO et anti-TG.

Une corrélation positive a été mise en évidence entre les taux sanguins et folliculaires de TSH, T3L, T4L et le titre des anticorps anti-TPO :

- Corrélation TSH sérique/folliculaire : $r=0.39$, $p<0.0001$, figure 7
- Corrélation T3L sérique/folliculaire : $r=0.20$, $p=0.0498$, figure 8
- Corrélation T4L sérique/folliculaire : $r=0.59$, $p<0.0001$, figure 9
- Corrélation Ac anti TPO sérique/folliculaire : $r=0.83$, $p<0.000$, figure 10
- Corrélation Ac anti TG sérique/folliculaire : $r=0.99$, $p<0.0001$, figure 11

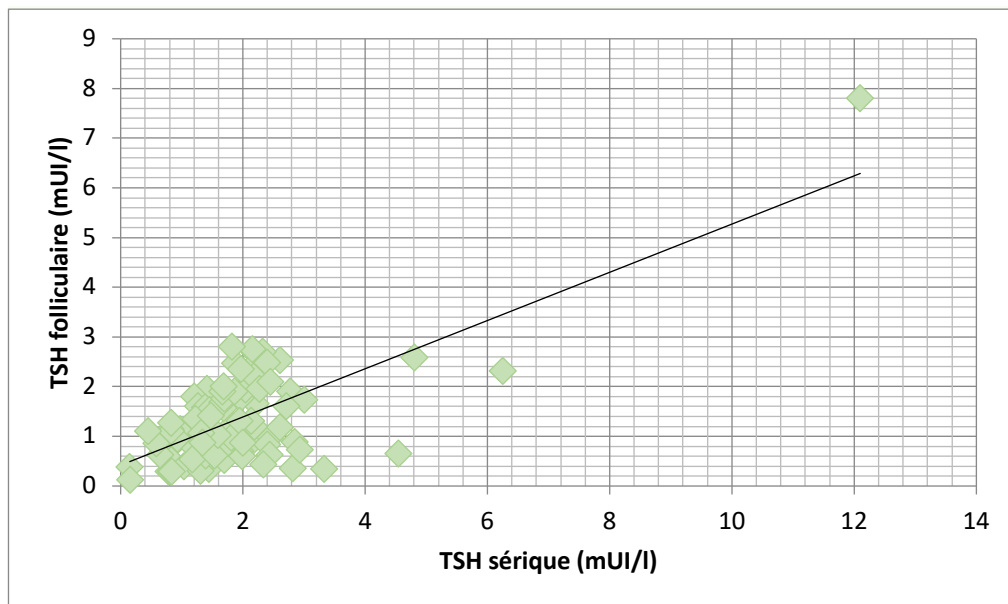


Figure 7: Corrélation TSH sérique versus TSH folliculaire ($r=0.39$, $p<0.0001$; $n=100$)

Nous avons découvert une hypothyroïdie non contrôlée lors d'une tentative de FIV (cf patiente 3, tableau 13). Le jour de la ponction ovocytaire, nous avons observé une TSH sérique à 12,1 mUI/l et folliculaire à 7,8 mUI/l, T3L sérique à 3,9 pmol/l et folliculaire à 3,5 pmol/l, T4L sérique à 1,08 ng/dl et folliculaire à 1,49 ng/dl. On observe une concordance entre ces valeurs sériques et folliculaires.

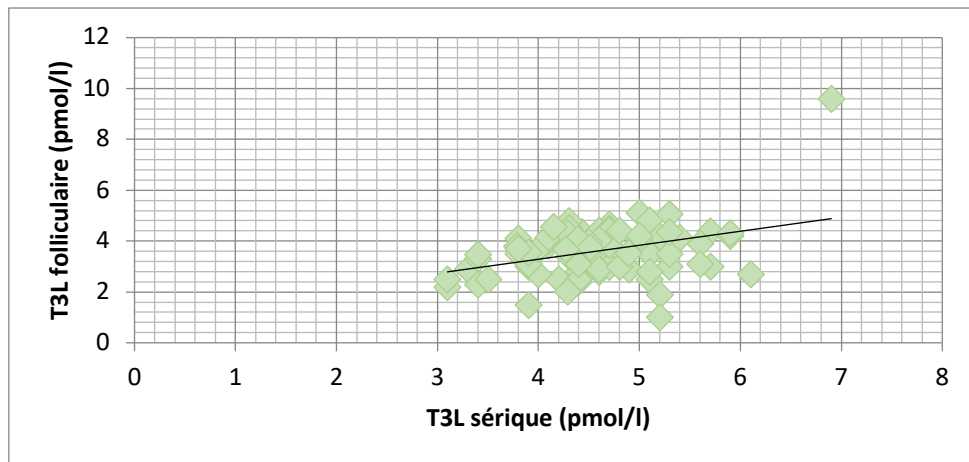


Figure 8: Corrélation T3L sérique versus T3L folliculaire ($r=0.20$, $p=0.0498$; $n=94$)

Pour une patiente, nous avons découvert le jour de la ponction ovocytaire une TSH basse. Ses dosages étaient : TSH sérique à 0,15 mUI/l et folliculaire à 0,376 mUI/l, T3L sérique à 6,9 pmol/l et folliculaire à 9,59 pmol/l, T4L sérique à 1,08 ng/dl et folliculaire à 1,5 ng/dl. On observe une concordance entre les valeurs sériques et folliculaires. Elle ne présentait pas d'antécédent thyroïdien connu. Une recherche des anticorps anti-récepteurs de la TSH était réalisée dans le sérum et le LF par dosage de type immunoradiométrique (kit Immunotech®) qui s'est révélée négative.

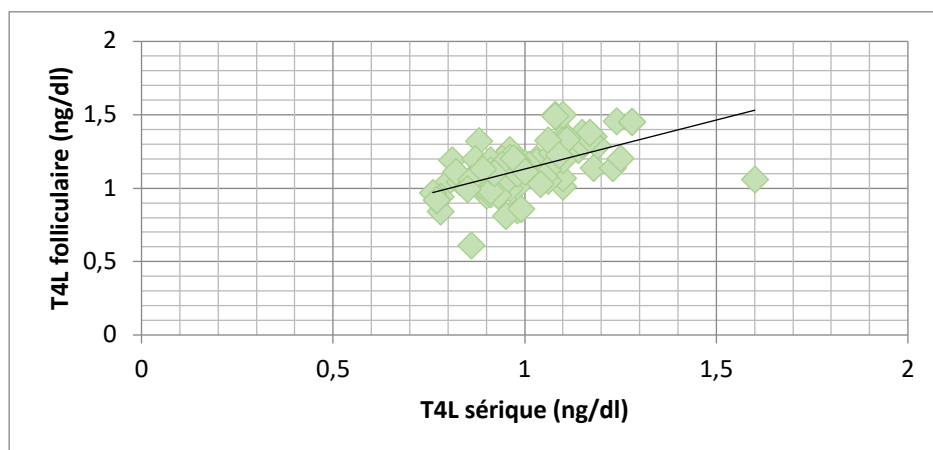


Figure 9: Corrélation T4L sérique versus T4L folliculaire ($r=0.59$, $p<0.0001$; $n=94$)

Une patiente présentait une T4L sérique plus élevée (1,6ng/dl) que la T4L folliculaire (1,06 ng/dl). Cette patiente avait une hypothyroïdie substituée par lévothyroxine. La TSH sérique était à 1,39 mUI/l et folliculaire à 0,62 mUI/l, T3L sérique à 5,6 pmol/l et folliculaire à 3,1 pmol/l. Chez cette patiente la T4L sérique élevée peut être en rapport avec la prise de lévothyroxine. On peut supposer un effet prise où le passage folliculaire de la lévothyroxine ne serait pas encore complet.

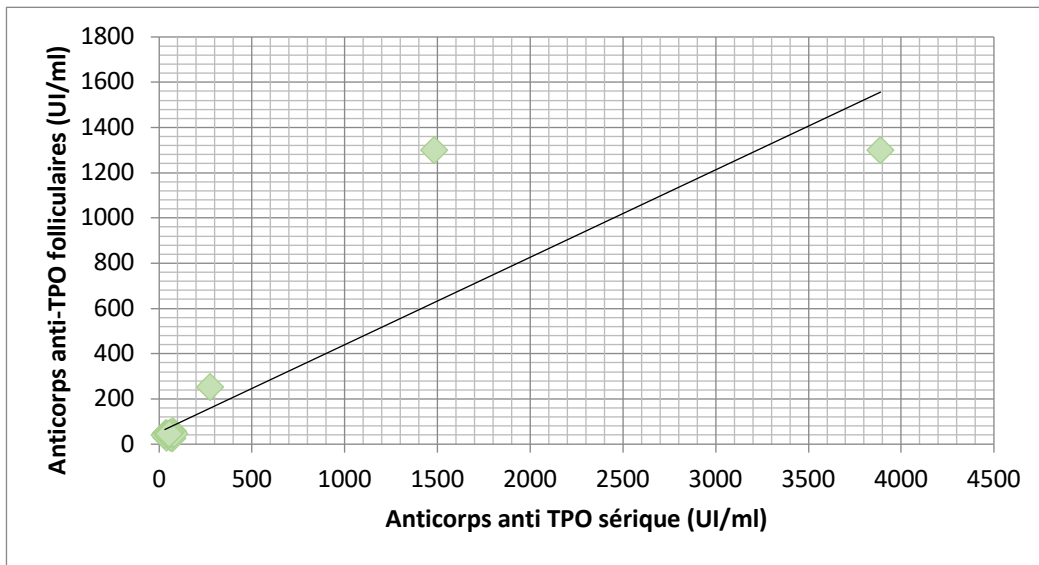


Figure 10: Corrélation anticorps anti-TPO sériques versus anticorps anti-TPO folliculaires ($r=0.83$, $p<0.0001$; $n=74$)

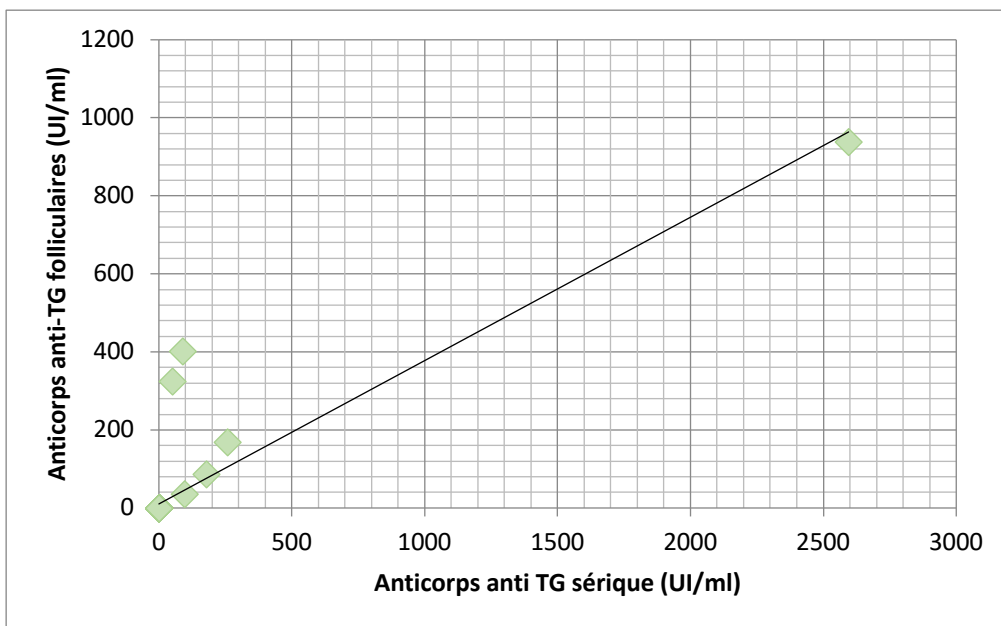


Figure 11: Corrélation anticorps anti-TG sériques versus anticorps anti-TG folliculaires ($r=0.99$, $p<0.0001$; $n=72$)

2. Axe somatotrope

La GH et l'IGF1 ont été détectés dans les LF. Il n'a pas été mis en évidence de corrélation pour la GH ($p=0.136$, figure 12), mais il existe une corrélation folliculo-sérique pour l'IGF1 ($r=0.34$, $p=0.039$, figure 13).

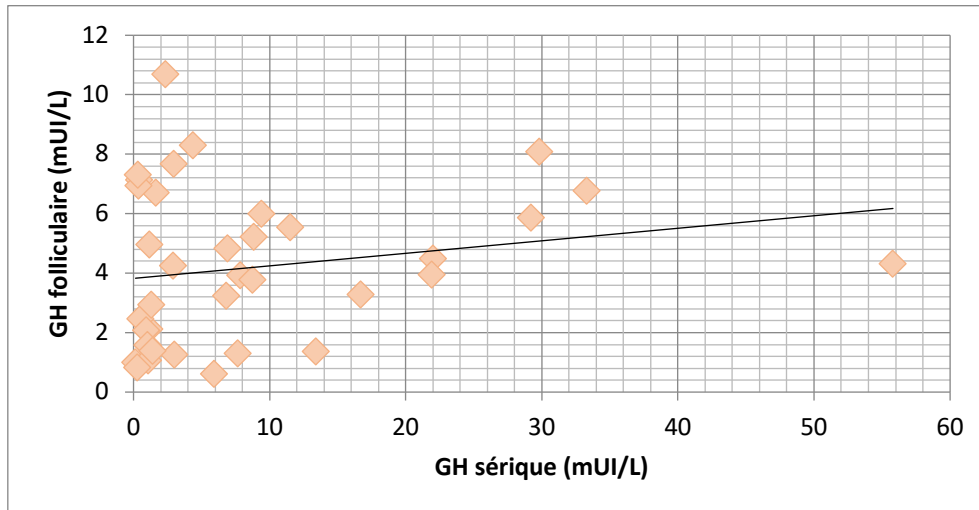


Figure 12: Corrélation GH sérique versus GH folliculaire (n=37)

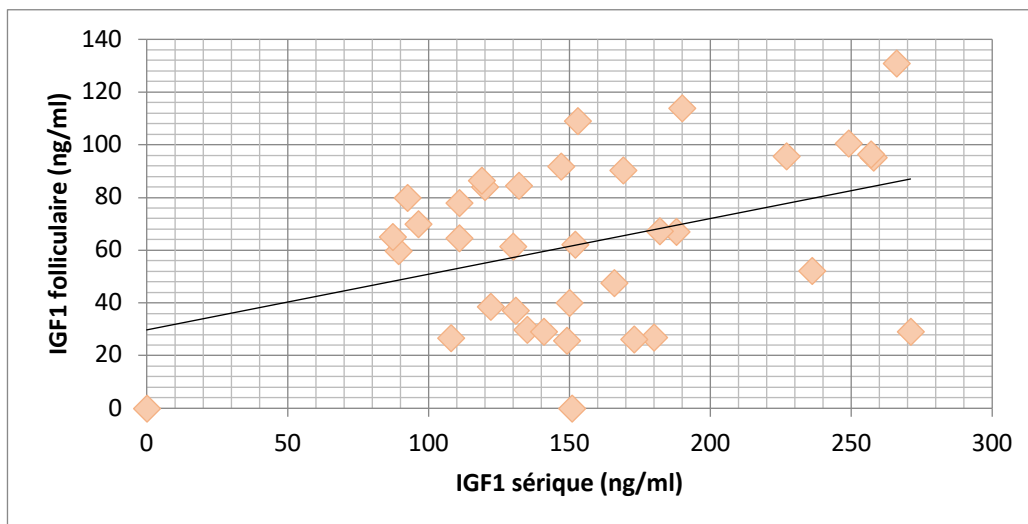


Figure 13: Corrélation IGF1 sérique versus IGF1 folliculaire ($r=0.34$, $p=0.039$; n=37)

Une de nos patientes présentait un hypopituitarisme (cf « Partie 2 »). La patiente a été traitée par GH (somatotropin 1,1 mg/jr) et lévothyroxine (75 mcg/jr) entre sa 3^{ème} et sa 4^{ème} tentative de FIV. Le tableau 14 présente les résultats des dosages hormonaux folliculaires et sériques correspondant à ces deux tentatives. L'IGF1 n'était pas détectable dans les LF avant la substitution par GH. Les concentrations de GH / IGF1 ont augmentées dans le sang et le LF sous GH. Les taux de T4L et de T3L ont augmenté dans le LF.

	T3 FIV <i>Sans traitement par GH et L-thyroxine</i>		T4 FIV <i>Avec traitement par GH et L-thyroxine</i>	
	Sang	Liquide folliculaire	Sang	Liquide folliculaire
GH (mIU/l)	1.39	1.39	2.95	7.68
IGF1 (ng/ml)	<25	<25	153	109
TSH (mUI/l)	2.71	1.6	0.16	0.12
T4L (ng/dl)	0.78	0.84	1.28	1.45
T3L (pmol/l)	3.1	2.5	3.8	3.7

Tableau 14: Dosages sériques et folliculaires d'une patiente hypopituitaire avant et après traitement par GH et lévothyroxine au cours de FIV

3. Vitamine D

La vitamine D a été détectée dans les LF. Il a été mis en évidence une corrélation folliculo-sérique ($r=0.87$, $p<0.0001$, figure 14).

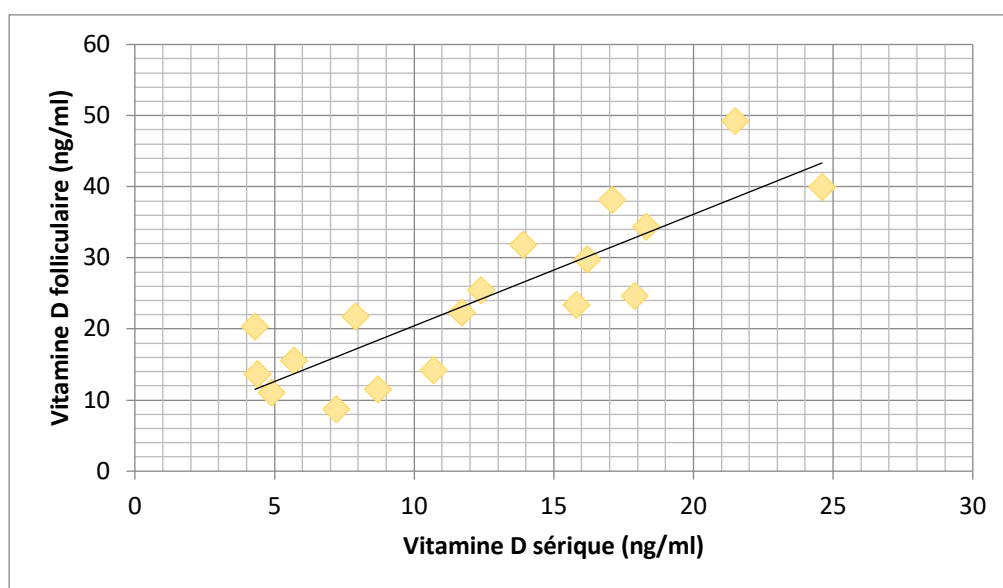


Figure 14: Corrélation vitamine D sérique versus vitamine D folliculaire ($r=0.87$, $p<0,0001$; $n=18$)

Synthèse :

- Mise en évidence d'une corrélation positive significative entre les taux sériques et folliculaires pour la TSH, T3L, T4L, les anticorps anti-TPO et anti-TG, l'IGF1 et la 25(OH)D
- Absence de corrélation folliculo-sérique pour la GH

IV. Discussion

Nous avons détecté dans les LF issus de FIV les hormones TSH, T4L, T3L, GH, IGF1, 25(OH)D et les anticorps anti-TPO et anti-TG.

Lors de l'analyse follicules par follicules, nous n'avons pas mis en évidence de différence majeure entre les concentrations folliculaires pour des follicules de maturité comparable. Par ailleurs, les coefficients de variation proches de ceux établis par le laboratoire dans le sérum valident notre technique pour le poolage des liquides folliculaires d'une même patiente. Dans la littérature, on ne trouve pas d'étude ayant comparé les taux folliculaires de ces différentes hormones en fonction de la taille des follicules. Il a uniquement été décrit que les concentrations folliculaires en GH (45) et IGF1(85) issus d'ovocytes matures sont plus importantes que celles d'ovocytes atériques ou immatures.

Nous observons une corrélation positive entre le sérum et le LF pour les hormones TSH, T4L, T3L, IGF1, 25(OH)D et les anticorps anti-TPO et anti-TG. Ces résultats sont concordants avec les données de la littérature.

En effet, la TSH est détectée dans les LF issus de FIV (32–34). Elle est corrélée aux taux sériques (32,34), la TSH folliculaire étant plus basse que la sérique (34).

Les HT T3L et T4L sont détectées dans les LF issus de FIV (33,34,37–39) avec une corrélation positive avec la concentration sérique (34,37). La T4L est plus élevée dans le sérum que dans LF (34), on observe l'inverse pour la T3L (34).

Les anticorps anti-TPO et anti-TG sont détectés dans les LF issus de FIV (33,34,44) où ils sont corrélés aux taux sériques (34,44). On observe que les taux sériques sont plus élevés que les taux folliculaires (34).

L'IGF1 est détecté dans les LF issus de FIV (45,46,48,61–69,69–79) ou de prélèvement d'ovaires issus de cœlioscopie (46,50,68). L'IGF1 est plus élevé dans le sérum que dans le LF (61–63,65,67,68,72,75). L'IGF1 folliculaire est corrélé aux taux sériques (61–63,66–68).

La 25(OH)D est détectée dans les LF issus de FIV (115–126). Il existe une corrélation positive entre les taux de 25(OH)D sériques et folliculaires (115,116,120,122,123,125,126), les taux folliculaires étant plus bas que les taux sériques (125).

Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre la GH sérique et folliculaire. Dans la littérature, la GH est détectée dans les LF issus de FIV (45–49) ou de prélèvements d'ovaires issus de cœlioscopie (46,50). La GH sérique est plus haute que celle du LF (47,49), mais elles sont corrélées l'une avec l'autre (49). Nous ne pouvons pas conclure sur nos résultats,

car il existe une variation circadienne de la GH avec notamment un pic en début d'après-midi (figure 15) (457). Dans notre étude, la prise de sang a été réalisée le jour de la ponction ovocytaire, mais à des horaires différents soit à l'entrée de l'hospitalisation (7h30) soit au moment de sa sortie (14h), la ponction folliculaire ayant pu être réalisée à n'importe quelle heure de la matinée. Ainsi il existe un biais important pour l'interprétation de nos résultats.

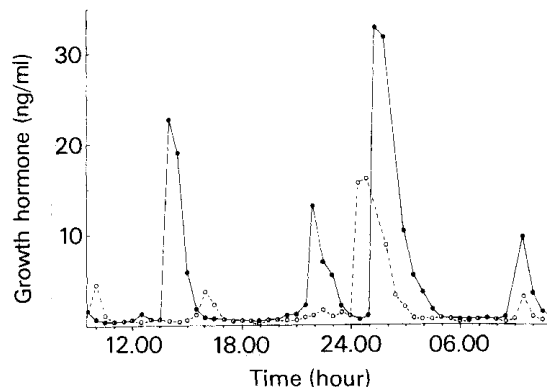


Figure 15: Cycle circadien de la GH (457)

La TSH, les HT et les ACAT, la GH, l'IGF1 et la 25(OH)D sont présents dans les LF. Se pose ensuite la question des mécanismes de passage ou de synthèse expliquant leur présence dans l'antrum folliculaire.

Le LF est un fluide extracellulaire complexe, semi-visqueux qui s'accumule dans l'antrum des follicules ovariens au cours de leur croissance. Il constitue le microenvironnement dans lequel le complexe cumulo-ovocytaire se développe et les cellules de la granulosa se différencient. La manière dont le fluide s'accumule n'est pas précisément connue. La principale hypothèse est un passage d'eau, d'électrolytes et de molécules de la circulation sanguine vers le LF sous l'effet d'un gradient osmotique. La concentration en électrolytes est similaire à la concentration sanguine. Cependant, les molécules de plus de 100 kilodaltons (kDa) sont présentes en plus faible concentration dans le LF. Ceci implique la présence d'une barrière hémato-folliculaire sélective en fonction du poids moléculaire. Cette barrière séparerait donc le LF de la circulation sanguine. Elle serait constituée de la paroi des capillaires sanguins, de l'épaisseur des cellules de la granulosa et de la thèque, et de la membrane basale qui les séparent. Cette barrière peut également exister en sens inverse. Ainsi, les grosses molécules produites par l'ovocyte ou les cellules de la granulosa ne peuvent pas traverser la membrane basale, créant ainsi un gradient osmotique potentiel. Ce gradient osmotique serait constitué par la sécrétion par les cellules de la granulosa, dans le LF, de molécules de plus de 300 kDa telles

que des protéoglycanes, des glycosaminoglycanes, de l'acide hyaluronique, des chondroïtines et dermatanes sulfates et de l'ADN. Le gradient osmotique ainsi créé pourrait être responsable du recrutement du liquide au centre du follicule [30]. Cependant, le transport des molécules d'eau pourrait être facilité par des aquaporines (protéines transmembranaires) mises en évidence sur les cellules de granulosa. Les aquaporines auraient probablement un rôle supplémentaire pour la transduction du fluide lors de l'ovulation [31]. Le transport du LF et des éléments de bas poids moléculaire pourrait donc être à la fois transcellulaire et péricellulaire. En parallèle de l'accumulation du liquide, un mouvement des cellules de la granulosa les unes par rapport aux autres est nécessaire à la formation de l'antrum.

En dehors de la GH, notre étude a permis de mettre en évidence une corrélation positive entre les taux sériques et folliculaires pour les différentes hormones et les ACAT. Cette corrélation nous oriente vers un transport passif des hormones et des ACAT dans le compartiment folliculaire. Les hormones et les ACAT diffuseraient de la circulation sanguine vers le LF comme l'eau, les électrolytes et les protéines de bas poids moléculaire. Ces hormones ont toutes un poids moléculaire inférieur à 100 kDa (GH : 22 kDa, IGF1 : 7,6 kDa, TSH : 28 kDa, T3 : 651 daltons, T4 : 776 daltons et 25(OH)D : 400 daltons) et peuvent donc passer la barrière hémato-folliculaire sans nécessiter de transporteur actif.

Plus spécifiquement pour la GH, plusieurs arguments vont dans le sens d'un passage passif de la GH dans le LF. Une équipe a mis en évidence une corrélation positive (49). L'ajout de GH en traitement adjuvant lors de protocole de FIV entraîne une augmentation de la GH sérique (53–56) et folliculaire (47,51–53). Chez notre patiente présentant un GHD, on observe une augmentation importante de la GH et de l'IGF1 folliculaires et sériques dans les mêmes proportions après mise sous traitement substitutif.

Nous faisons les mêmes constatations pour la TSH et les HT, lorsque nous observons des valeurs pathologiques dans le sérum, elles sont en concentrations comparables dans le LF argumentant aussi vers un passage passif.

En parallèle de ce passage passif, il pourrait cependant y avoir une régulation locale de certaines hormones. En effet, plusieurs études démontrent aussi une production locale et une régulation intraovarienne de l'IGF1. En effet, il est mis en évidence dans l'ovaire au niveau dans les cellules de la granulosa à partir du stade préovulatoire (84–86) et dans les cellules de la thèque à partir du stade antral (86–88). Après ajout de GH in vitro chez l'animal, on observe une augmentation de la sécrétion d'IGF1 par les cellules de la granulosa et de la thèque chez le porc (191) et une stimulation de l'expression de l'IGF1 et de son récepteur chez le rat (209).

Par ailleurs, les gonadotrophines et les stéroïdes sexuels joueraient aussi un rôle dans le système des IGFs. En effet chez l'animal, l'ajout de FSH ou d'œstradiol dans des cultures de cellules de la granulosa augmente la production d'IGF1 (303,304). Un traitement par androgènes augmente l'IGF1 et son récepteur au niveau des ovocytes des follicules primordiaux (305). In vitro chez l'humain, l'ajout de FSH ou d'HCG augmente aussi l'expression de l'IGF1 et 2 par les cellules de la granulosa (217,301,306). Chez les souris KO GHR, on observe des taux folliculaires d'IGF1 normaux malgré une maturation folliculaire retardée (203,204) reflétant probablement la capacité d'autres hormones (comme la FSH et l'œstradiol) à activer la production d'IGF1 (304). Les IGFBPs folliculaires entraînent des changements dans la biodisponibilité des IGFs folliculaires et sont aussi des acteurs dans la folliculogénèse et la stéroïdogénèse ovarienne. Dans des cultures folliculaires humaines, il a été mis en évidence une synthèse des IGFBPs au sein des cellules de la granulosa (102,296,298,319–321). Il a été démontré chez l'animal que leurs concentrations varient en fonction du stade de développement folliculaire (311–314). Par ailleurs, il a été trouvé une régulation de leur expression par les gonadotrophines (317,318). Nous pouvons donc supposer que la régulation du système des IGFs par la GH serait partiellement dépendante des gonadotrophines. Ainsi l'élévation des gonadotrophines lors de la croissance folliculaire permet d'augmenter la synthèse en IGFs et de réduire la concentration folliculaire en IGFBPs. Ceci entraîne ainsi une meilleure biodisponibilité des IGFs pour stimuler la prolifération des cellules de la granulosa et la stéroïdogénèse. À l'inverse lors de l'atrésie folliculaire, la baisse des gonadotrophines entraîne une augmentation des IGFBPs réduisant les IGFs folliculaires.

Concernant les HT, il a été mis en évidence que les cellules de la granulosa humaines expriment les DOI 2 et DOI 3. Elles sont aussi présentes au sein des cellules épithéliales superficielles de l'ovaire (35,40). Leur présence implique la possibilité d'une conversion périphérique possible de la T4 en T3 ou d'inactivation de la T4 en T3r. Cette conversion pourrait être influencée par l'action folliculaire de la TSH sur les DOI. De plus, il a été mis en évidence l'expression du symporteur Na⁺/I⁻ dans l'ovaire humain (458). Ainsi une régulation intraovarienne des HT pourrait exister. En effet, les éléments clés impliqués dans la synthèse et la régulation des HT sont retrouvés dans l'ovaire : la TSH et son récepteur, la thyroglobuline ainsi que l'iode et son symporteur.

Cette première analyse des LF permet de valider notre technique de dosage des hormones TSH, T4L, T3L, GH, IGF1, 25(OH)D et des anticorps anti-TPO et anti-TG. Nous allons nous intéresser par la suite à leurs potentielles associations avec les résultats de FIV.

Partie 5

Analyse 2 : Étude de la qualité ovocytaire

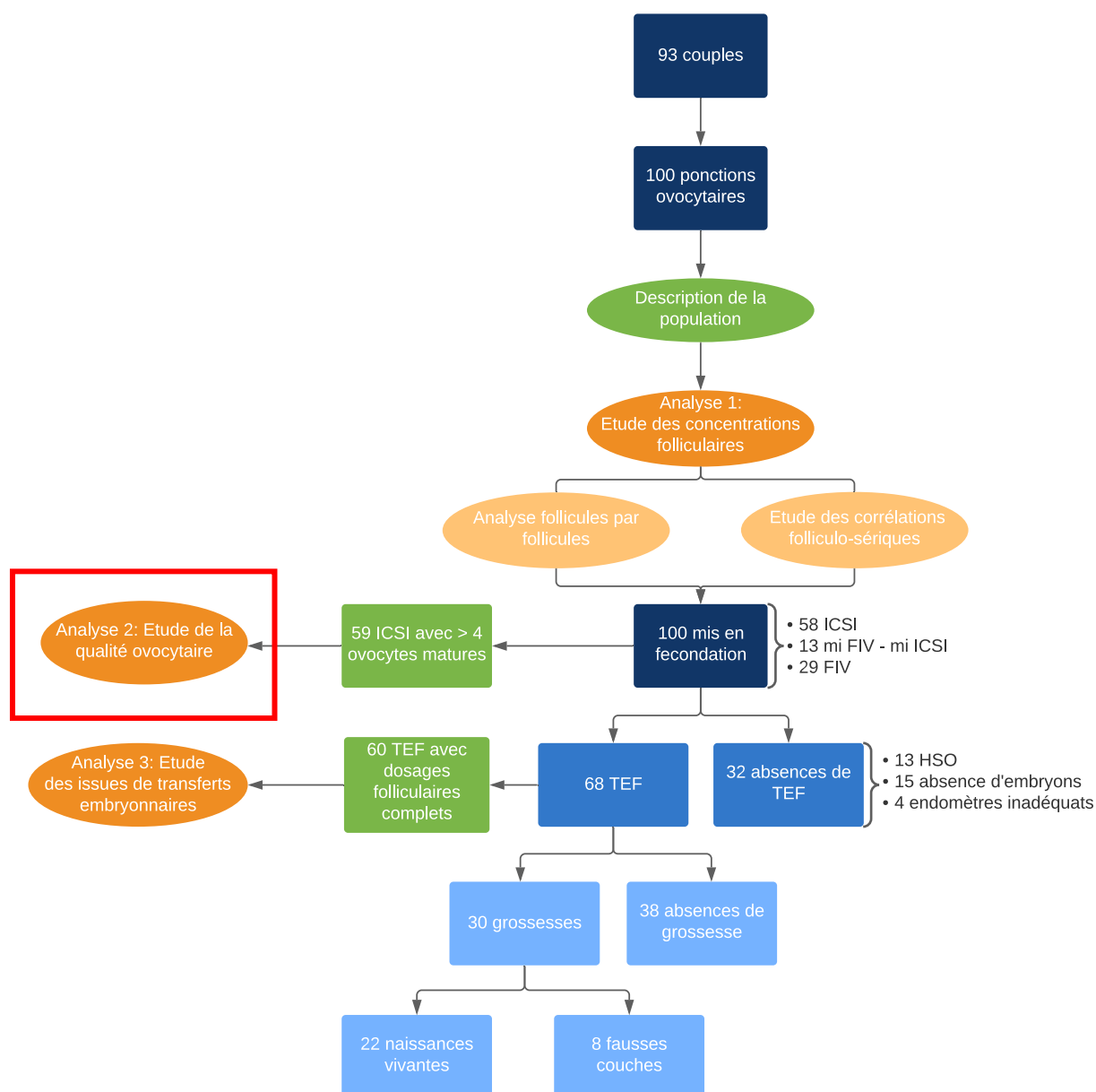


Figure 2: Flow chart de l'étude

I. Objectif

L'objectif de cette 2^{ème} analyse était de rechercher une association entre la qualité des ovocytes issus d'ICSI et les concentrations folliculaires et sériques en TSH, T4L, T3L, GH, IGF1, 25(OH)D, anticorps anti-TPO et anti-TG.

II. Matériel et méthodes

A. Évaluation de la maturité et de la qualité ovocytaire

Pour cette deuxième analyse, nous avons sélectionné dans notre population initiale toutes les tentatives d'ICSI. Nous avons exclu toutes les patientes ayant eu une faible réponse ovarienne où moins de 4 ovocytes matures étaient observés après décoronisation ainsi que les patientes présentant en endométriose sévère (stade III/IV) et/ou ovarienne (459).

Suite à la décoronisation avant l'ICSI, les ovocytes furent observés sous microscope pour évaluer leur degré de maturité ovocytaire par la présence ou non d'un globule polaire au niveau de l'ovocyte (figure 16). La présence d'ovocytes lysés, de pellucides vides (PV) ou de VG a aussi été notée.

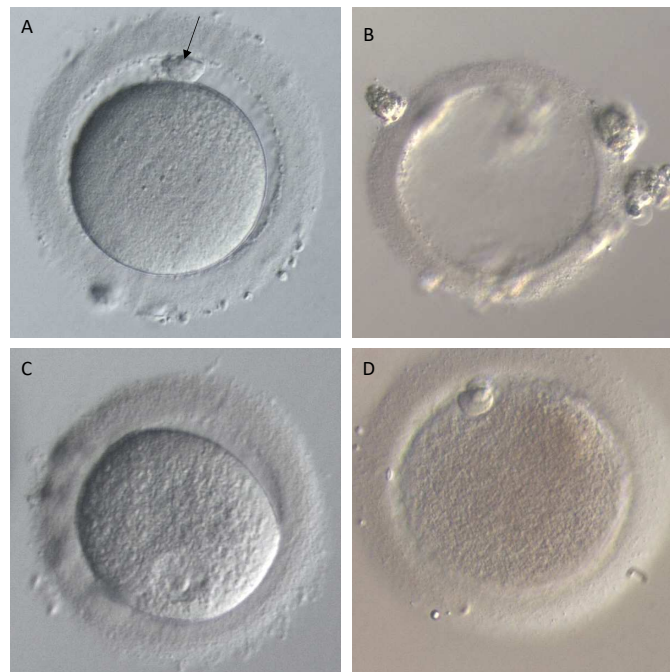


Figure 16: Évaluation de maturité ovocytaire

A : Ovocyte mature normal avec présence d'un globule polaire (flèche) ; B : Pellucide vide ;

C : Vésicule germinative ; D : Ovocyte en cours de lyse

La qualité ovocytaire a été évaluée par la présence d'anomalies morphologiques. Chaque anomalie a été colligée pour chaque ovocyte : granulations cytoplasmiques diffuses, corps réticulés, vacuoles, ovocytes collants ou mous, EPV augmenté, EPV avec débris (figure 17).

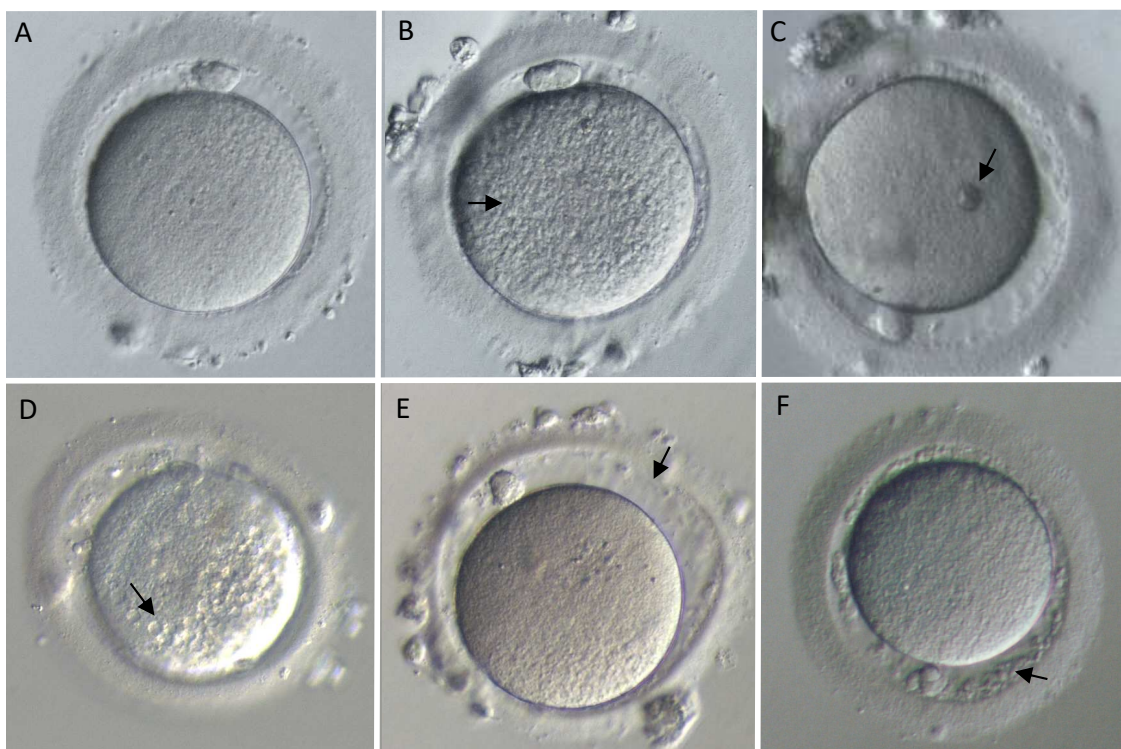


Figure 17: Évaluation des anomalies morphologiques ovocytaires
A : Ovocyte normal, B : Granulations cytoplasmiques diffuses, C : Corps réticulés,
D : Vacuole, E : Espace périvitellin (EPV) augmenté, F : EPV avec fragments

B. Constitution des groupes

Parmi ces tentatives d'ICSI, nous avons constitué deux cohortes en prenant le seuil de 50% d'anomalies morphologiques ovocytaires aux vues des données de la littérature, de notre pratique clinique et de la répartition des anomalies morphologiques dans notre cohorte :

- **Cohorte ovocytaire anormale** : Plus de 50% des ovocytes présentant au moins une anomalie morphologique,
- **Cohorte ovocytaire normale** : 50% ou moins d'ovocytes présentant au moins une anomalie morphologique.

III. Résultats

A. Distribution des anomalies ovocytaires

Parmi les 100 ponctions ovocytaires, 71 mises en fécondation en ICSI ont eu lieu. Pour cette analyse, nous avons pu inclure 63 tentatives avec ICSI où il y avait au moins 4 ovocytes matures après décoronisation pour 60 couples. 4 patientes ont été exclues devant la présence d'une endométriose pelvienne sévère. Au total, 59 tentatives d'ICSI ont été retenues pour l'analyse. 520 ovocytes ont été analysés, 307 (59%) présentaient au moins une anomalie morphologique. 217 (41,7%) présentaient une anomalie, 80 (15,4%) deux anomalies, 10 (1,9%) trois anomalies ou plus.

Parmi ces tentatives nous avons constitué les deux cohortes en fonction de la qualité ovocytaire :

- **Cohorte ovocytaire anormale** : n=34 tentatives, avec un total de 310 ovocytes matures analysés, dont 246 ovocytes (79,4%) ayant au moins une anomalie morphologique,
- **Cohorte ovocytaire normale** : n=25, avec un total de 210 ovocytes matures analysés, dont 61 ovocytes (29%) ayant au moins une anomalie morphologique.

La figure 18 représente la proportion du type d'anomalies morphologiques dans les cohortes ovocytaires normale et anormale. Plus de la moitié des anomalies morphologiques étaient un cytoplasme granuleux.

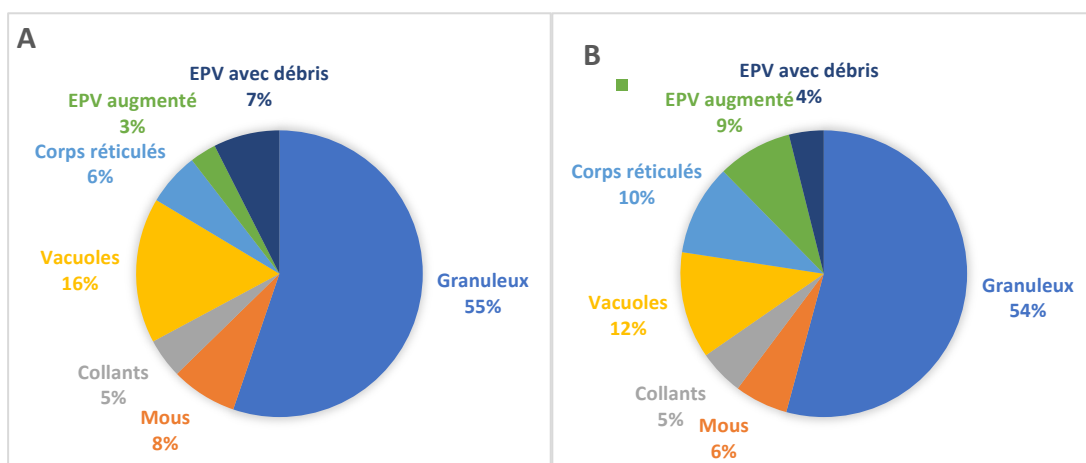


Figure 18: Répartition du type d'anomalies morphologiques dans les cohortes ovocytaires normale et anormale (A): Cohorte ovocytaire normale, n=61 oocytes, (B): Cohorte ovocytaire anormale, n=246 oocytes
EPV: Espace périvitellin

La figure 19 présente la répartition du nombre d'anomalies ovocytaires par patientes dans chacune des cohortes ovocytaires ainsi que le nombre d'ovocytes par patientes. On observe que la majorité des ovocytes présentaient une seule anomalie. La présence de 3 anomalies morphologiques ne s'observait que dans la cohorte ovocytaire anormale.

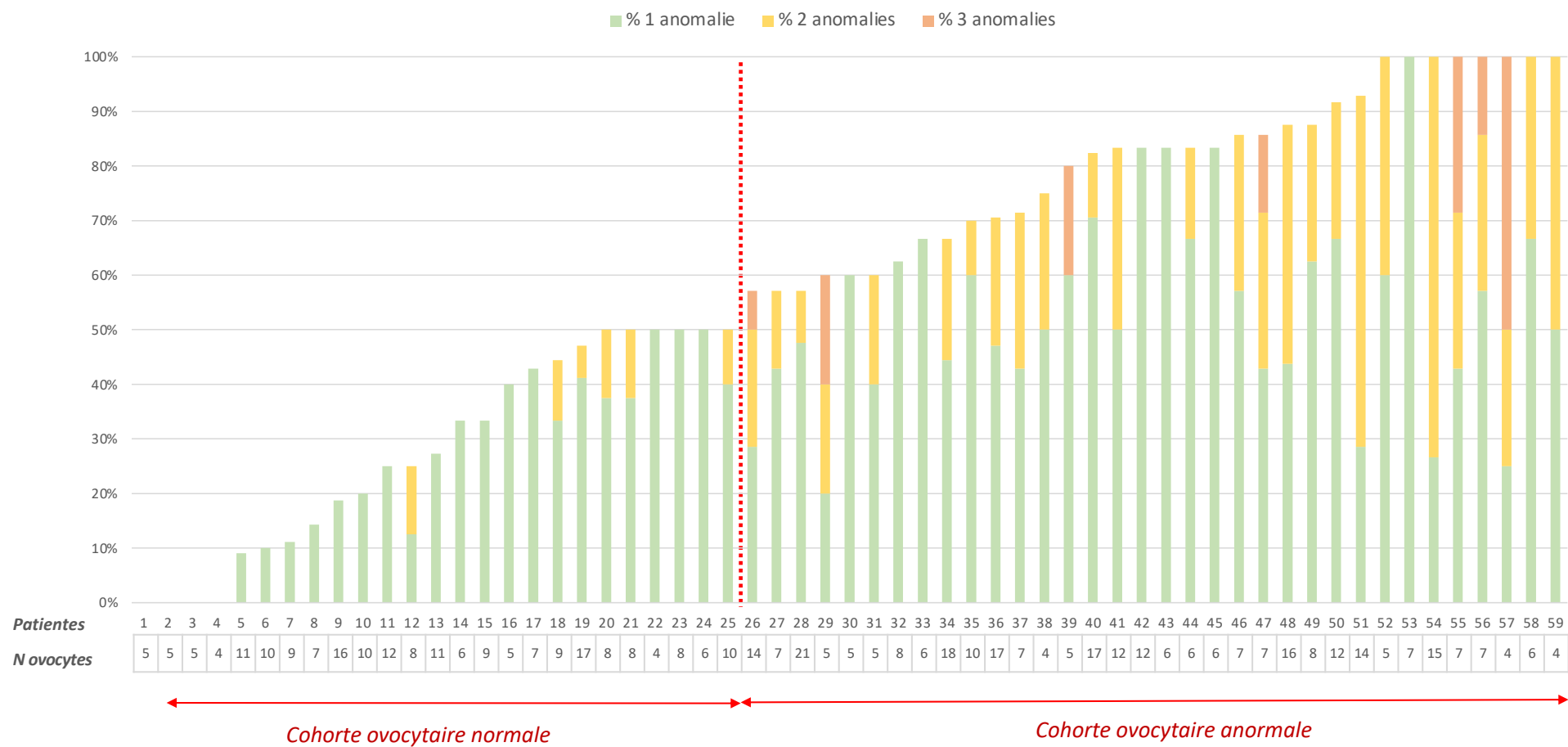


Figure 19: Répartition du nombre d'ovocytes et d'anomalies ovocytaires par patientes dans les cohortes ovocytaires

B. Caractéristiques de la population et issues des tentatives d'ICSI

Le tableau 15 décrit les caractéristiques de la population, on ne note pas de différence entre les deux groupes concernant les caractéristiques cliniques.

	Cohorte ovocytaire anormale (n = 34)	Cohorte ovocytaire normale (n = 25)	p
Durée infertilité (années)	3.50 [3.00; 5.00]	4.00 [3.00; 4.00]	0.85
Caractéristiques féminines :			
- <i>Âge</i>	31.5 [29.0; 34.8]	30.0 [29.0; 34.0]	0.69
- <i>IMC</i>	23.0 [21.2; 27.0]	21.0 [20.0; 25.0]	0.096
- <i>Tabac</i>	15%	20%	0.73
- <i>FSH J3 (UI/L)</i>	6.05 [4.82; 6.95]	5.60 [4.40; 7.00]	0.7
- <i>AMH (ng/mL)^a</i>	3.7 [2.8; 8.60]	3.30 [2.00; 4.50]	0.4
- <i>BRO</i>	5,9%	8%	1
- <i>SOPK</i>	35%	24%	0.35
Paramètres spermatiques :			
- <i>Numération (M/ml)</i>	38.2 [16.3; 79.3]	22.9 [12.0; 59.2]	0.19
- <i>Mobilité (% totale)</i>	40.0 [35.0; 50.0]	35.0 [25.0; 45.0]	0.09
- <i>Mobilité (% a+b)</i>	35.0 [30.0; 45.0]	27.5 [15.0; 40.0]	0.07

Tableau 15: Caractéristiques de la population féminine en fonction de la qualité ovocytaire.

Les résultats sont exprimés en médiane et Q25-75 ou pourcentage. ^a : données manquantes n= 15
 IMC : indice de masse corporelle ; FSH : Hormone folliculostimulante ; AMH : Hormone antimüllérienne ;
 BRO : baisse de réserve ovarienne ; SOPK : syndrome des ovaires polykystiques

Le tableau 16 décrit les paramètres de la stimulation, la description des cohortes ovocytaires et les résultats des tentatives d'ICSI en fonction de la cohorte ovocytaire. On n'observe pas de différence concernant les différents paramètres de la stimulation.

Concernant la description ovocytaire, on n'observe pas de différence sur la maturité ovocytaire. La proportion d'ovocytes ayant plus d'une anomalie morphologique est plus importante dans la cohorte ovocytaire anormale.

Le taux de fécondation est significativement plus faible dans la cohorte ovocytaire anormale (65,5% vs 80%, p= 0,012). On ne note pas de différence concernant les taux de développement embryonnaire et les issues de grossesse.

	Cohorte ovocytaire anormale (n = 34)	Cohorte ovocytaire normale (n = 25)	p
Paramètres de la stimulation			
Protocoles de stimulation			
- Antagoniste	9%	12%	0.69
- Agoniste long	91%	88%	
Durée de la stimulation (jours)	11.5 [10.2; 13.0]	12.0 [10.0; 13.0]	0.66
Nombre total unité FSH (UI)	1775 [1350; 2681]	1650 [1350; 2200]	0.67
Taux E2 J-hCG (pg/ml)	2127 [1585; 2828]	2003 [1450; 2735]	0.94
Description ovocytaire			
Nombre total d'ovocytes	14.5 [9.25; 19.0]	12.0 [8.00; 15.0]	0.19
Nombre d'ovocytes mis en ICSI	7.00 [6.00; 12.0]	8.00 [6.00; 10.0]	0.98
Taux d'ovocytes matures	73.7 [59.5; 77.8]	75.0 [68.8; 83.3]	0.15
Taux d'ovocytes anormaux	83.3 [67.5; 92.6]	27.3 [11.1; 47.1]	<0.001
Distribution des anomalies morphologiques ovocytaires :			
- Une anomalie	52.8%	25.7%	<0,001
- Deux anomalies	23.9%	2.9%	
- Trois ou plus anomalies	3.2%	0%	
Résultats d'ICSI			
Taux de fécondation	65.5 [44.7; 83.3]	80.0 [68.8; 88.9]	0.012
Taux de développement embryonnaire à J2	50.0 [25.0; 88.9]	62.5 [39.6; 77.5]	0.66
Taux de transfert / ponction	65%	72%	0.55
Taux de congélation embryonnaire / ponction	44%	40%	0.75
Taux de grossesses / transfert	45%	50%	0.77
Taux de naissances vivantes / transfert	32%	44%	0.41

Tableau 16: Réponse ovarienne, description ovocytaire et résultats d'ICSI en fonction de la qualité ovocytaire.

Les résultats sont exprimés en médiane et Q25-75 ou pourcentage. FSH: gonadotrophines; E2: oestradiol; hCG: human chorionic gonadotropin

C. Analyse des concentrations sériques et folliculaires

Le tableau 17 décrit les dosages sériques et folliculaires en TSH, T3L, T4L, GH, IGF1, 25(OH)D et la présence d'ACAT. On observe que la GH folliculaire est significativement plus haute dans la cohorte ovocytaire normale (4,98 vs 2,75 ; $p < 0,01$) tout comme l'IGF1 folliculaire (72,1 vs 54,2 ; $p = 0,05$). On n'observe pas de différence concernant leurs concentrations sériques. Aucune différence significative n'est mise en évidence pour les concentrations sériques et folliculaires en TSH, T3L, T4L, 25(OH)D et ainsi que pour la présence d'ACAT.

L'IGF1 ne suivant pas une répartition gaussienne et afin de confirmer nos résultats sur l'IGF1, nous avons séparé notre cohorte initiale en 2 groupes en fonction de la médiane folliculaire de l'IGF1 dans la cohorte (supérieur ou inférieur à 65,1ng/ml). Nous avons recherché une association entre ces deux groupes et le pourcentage d'ovocytes présentant au moins une anomalie ovocytaire par patiente. Nous observons que les patientes ayant un IGF1 inférieur à la médiane ont significativement plus d'ovocytes anormaux que celles qui ont un IGF1 supérieur à la médiane (70,6% vs 45,8%, $p = 0,029$).

	n	Cohorte ovocytaire anormale (n = 34)	Cohorte ovocytaire normale (n = 25)	p
Axe thyroïdienne				
TSH folliculaire (mUI/l)	59	1.12 [0.735; 1.73]	1.51 [0.970; 2.00]	0.3
TSH sérique (mUI/l)	57	1.64 [1.21; 2.09]	2.04 [1.49; 2.34]	0.14
T3L folliculaire (pmol/l)	59	3.59 [3.00; 4.2]	3.75 [3.30; 4.17]	0.91
T3L sérique (pmol/l)	57	4.31 [3.92; 4.7]	4.39 [4.15; 4.70]	0.84
T4L folliculaire (ng/dl)	59	1.09 [1.04; 1.19]	1.15 [1.05; 1.22]	0.42
T4L sérique (ng/dl)	57	0.960 [0.885; 1.05]	0.990 [0.930; 1.09]	0.22
Anticorps anti-TPO folliculaire	42	3.3%	17%	0.19
Anticorps anti-TPO sérique	57	15%	26%	0.32
Anticorps anti-TG folliculaire	41	0%	17%	0.08
Anticorps anti-TG sérique	57	5.9%	13%	0.38
Axe somatotrope				
GH folliculaire (mUI/l)	59	2.75 [1.95; 4.24]	4.98 [2.84; 7.05]	<0.01
GH sérique (mUI/l)	25	1.09 [0.45; 6.16]	5.61 [1.22; 8.83]	0.2
IGF1 folliculaire (ng/mL)	59	54.2 [35.1; 84.6]	72.1 [62.1; 95.6]	0.05
IGF1 sérique (ng/mL)	25	135 [121; 174]	152 [122; 186]	0.85
Vitamine D				
25(OH)D folliculaire (ng/ml)	52	24.5 [18.1; 29.6]	22.8 [14.5; 33.7]	0.98
25(OH)D sérique (ng/ml)	12	15.1 [13.8; 16.5]	12.8 [7.58; 16.8]	0.61

Tableau 17: Dosages hormonaux et présence d'ACAT folliculaires et sériques en fonction de la qualité ovocytaire.

Les résultats sont exprimés en médiane et Q25-75 ou pourcentage.

Synthèse :

- > 50% des anomalies morphologiques ovocytaires sont des granulations cytoplasmiques.
- Plus d'ovocytes avec des anomalies multiples dans la cohorte ovocytaire anormale.
- Taux de fécondation plus faible dans la cohorte ovocytaire anormale.
- Concentrations en GH et IGF folliculaires plus hautes dans la cohorte ovocytaire normale.
- Concentration en IGF1 folliculaire significativement associée au pourcentage d'ovocytes anormaux.
- Pas de différence pour les concentrations sériques en GH et IGF1.
- Pas de différence pour les concentrations folliculaires et sériques en TSH, T3L, T4L, 25(OH)D et la présence d'anticorps antithyroïdiens.

Lors de la rédaction de l'article issu de cette analyse, nous avons décidé de ne présenter et de ne discuter uniquement que les concentrations folliculaires au vu du nombre de données manquantes concernant les concentrations sériques. L'article issu de cette analyse présenté ci-dessous a été accepté pour publication dans « *Frontiers in endocrinology* » le 15 novembre 2021, il est en cours d'édition.



Follicular GH and IGF1 Levels Are Associated With Oocyte Cohort Quality: A Pilot Study

Florence Scheffler^{1,2*}, Albane Vandecandelaere¹, Marion Soyez², Dorian Bosquet^{1,3}, Elodie Lefranc¹, Henri Copin¹, Aviva Devaux^{1,3}, Moncef Ben Khalifa^{1,3}, Rosalie Cabry^{1,3} and Rachel Desailoud^{3,4}

¹ Reproductive Medicine and Biology Department and CECOS of Picardy, Amiens University Hospital, Amiens, France, ² Endocrine and Bone Biology Department, Amiens University Hospital, Amiens, France, ³ Peritox UMR_J 01, CURS, Jules Verne University of Picardy, Amiens, France, ⁴ Endocrinology, Diabetes, and Nutrition Department, Amiens University Hospital, Amiens, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Alessandro Conforti,
University of Naples Federico II, Italy

Reviewed by:

Rita Canipari,
Sapienza University of Rome, Italy
Nalini Mahajan,
Independent Researcher,
New Delhi, India

*Correspondence:

Florence Scheffler
scheffler.florence@chu-amiens.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Reproduction,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 12 October 2021

Accepted: 15 November 2021

Published: xx xx 2021

Citation:

Scheffler F, Vandecandelaere A, Soyez M, Bosquet D, Lefranc E, Copin H, Devaux A, Ben Khalifa M, Cabry R and Desailoud R (2021) Follicular GH and IGF1 Levels Are Associated With Oocyte Cohort Quality: A Pilot Study. *Front. Endocrinol.* 12:793621. doi: 10.3389/fendo.2021.793621

Introduction: Oocyte quality contributes to the development of an optimal embryo and thus a successful pregnancy. The objective of this study was to analyse the association between oocyte cohort quality and the follicular levels of growth hormone (GH), insulin-like growth factor 1 (IGF1), 25-hydroxy vitamin D (25OHD), thyroid-stimulating hormone (TSH), free triiodothyronine (fT3), free thyroxine (fT4) and antithyroid antibodies, as a function of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcomes.

Material and methods: We conducted a prospective comparative pilot study from January 2013 to December 2017. 59 ICSI cycles constituted an abnormal oocyte cohort (n=34 cycles, in which more than 50% of oocytes presented at least one morphological abnormality) and a normal oocyte cohort (n=25 cycles, in which 50% or less of the oocytes presented at least one morphological abnormality). GH, IGF1, 25OHD, TSH, fT3, fT4 and antithyroid antibodies were measured in follicular fluid.

Results: The fertilisation rate was lower in the abnormal oocyte cohort (65.5% vs. 80%, respectively, p=0.012). Oocytes' proportion with at least one abnormality was 79.4% in the abnormal oocyte cohort and 29.0% in the normal oocyte cohort. The mean number of morphological abnormalities per oocyte was significantly higher in the abnormal oocyte cohort. The follicular levels of GH (4.98 vs. 2.75 mIU/L, respectively; p<0.01) and IGF1 (72.1 vs. 54.2 ng/mL, respectively; p=0.05) were higher in the normal oocyte cohort. There was no association with follicular levels of TSH, fT3, fT4, antithyroid antibodies, or 25OHD.

Conclusion: Oocyte cohort quality appears to be associated with follicular levels of GH and IGF1.

Keywords: oocyte morphological abnormality, follicular fluid, intracytoplasmic sperm injection, growth hormone, insulin-like growth factor 1, thyroid-stimulating hormone, thyroid hormones, 25-hydroxy vitamin D

Q10 INTRODUCTION

Gamete quality is one of the many factors involved in the success or failure of *in vitro* fertilisation (IVF). With the development of the intracytoplasmic sperm injection (ICSI), a decoronized oocyte's nuclear maturity and morphological structure can be assessed precisely. Oocyte quality contributes to the development of an optimal embryo and thus a successful pregnancy (1). However, 10 to 60% of the oocytes obtained after controlled ovarian stimulation (COS) for IVF present morphological abnormalities, such as diffuse cytoplasmic granularity, refractile bodies, vacuoles, large perivitelline space, perivitelline debris, irregular shape, and a fragmented or large first polar body (1–5). These morphological abnormalities are not well understood but may be caused by intrinsic factors (such as age and genetic defects) and/or extrinsic factors (such as the stimulation protocol, oocyte culture conditions, and nutrition) (1). Follicular fluid (FF) provides the microenvironment for oocyte maturation (6). It contains hormones with pleiomorphic effects involved in ovarian folliculogenesis, oogenesis, and steroidogenesis. Various studies have shown that growth hormone (GH), insulin-like growth factor 1 (IGF1), thyroid-stimulating hormone (TSH), and thyroid hormones [THs, e.g. free triiodothyronine (fT3) and free thyroxine (fT4)] have an influence on ovarian function. GH has both direct and indirect (IGF1-mediated) stimulatory effects on folliculogenesis, oocyte maturation, and steroidogenesis (7, 8). TH improves granulosa cell proliferation (9), inhibits apoptosis of the latter (10), and contributes to steroidogenesis by increasing the secretion of oestradiol and progesterone by granulosa cells (11, 12). More recently, it was reported that 1-25-hydroxy vitamin D (1-25OHD) is a factor in ovarian folliculogenesis (13, 14) and steroidogenesis (15).

The objective of the present study was to assess the putative association between oocyte cohort quality in an ICSI programme and follicular levels of GH, IGF1, 25-hydroxy vitamin D (25OHD), TSH, fT3, fT4, anti-thyroperoxidase (TPO) antibodies, and anti-thyroglobulin (TG) antibodies, as a function of the ICSI outcomes.

MATERIALS AND METHODS

We conducted a prospective pilot study at a reproductive medicine centre at Amiens-Picardie University Hospital (Amiens, France) from January 2013 to December 2017. The study protocol was approved by the local investigational review board (Amiens, France; reference: RCB 2011-A00634-37). All the study participants (couples participating in an ICSI programme, regardless of the indication) provided their informed consent. All the women were euthyroid at the time when their ICSI programme started. The main inclusion criteria were first or second ICSI cycle, age under 36 (for women) or 45 (for men), and a sperm concentration greater than 5×10^6 /mL. Patients with stage III/IV endometriosis and/or ovarian

endometrioma were excluded. We also excluded ICSI cycles with less than 4 mature oocytes after decoronization.

COS and IVF Protocols

Two COS protocols were used: a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) long agonist protocol and a GnRH antagonist protocol.

The long agonist protocol involved pituitary downregulation with a GnRH agonist (triptorelin acetate: Décapeptyl[®], Ipsen Pharma, France; 0.1 mg per day for 14 days, starting in the midluteal phase), followed by the administration of recombinant human follicle-stimulating hormone (rFSH: Puregon[®], Organon, France, or Gonal-F[®], Merck Serono SAS, France) or human menopausal gonadotropin (HMG, Menopur[®], Ferring, France), in combination with a GnRH agonist (triptorelin acetate: Décapeptyl[®], Ipsen Pharma, France; 0.05 mg per day).

In the antagonist protocol, rFSH was administered subcutaneously each day from day 2 of the cycle until a 14 mm dominant follicle was detected. Cetrorelix acetate (Cetrotide[®], Merck Serono, France; 0.25 mg per day) was then administered daily until the recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) day (Ovitrelle[®], Merck Serono SAS).

The stimulation protocols and the type and dose of FSH were chosen by the gynaecologist, as a function of the patient's age, body mass index (BMI), and ovarian reserve (anti-Müllerian hormone (AMH) level, antral follicle count, and basal FSH level).

Patients were monitored clinically using transvaginal pelvic ultrasound and assays for oestradiol, progesterone, and luteinizing hormone. The rFSH/HMG dose level was adjusted according to the follicular growth measured during the monitoring phase. When at least three follicles had reached a diameter of more than 16 mm, a 250 µg dose of rhCG was administered. Oocytes were retrieved 36 h after hCG administration, *via* ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration.

Cumulus cells were mechanically and enzymatically decoronized from the oocyte complexes 38 h after the rhCG administration. All mature oocytes were used for ICSI according to standard protocols regardless of their morphology, and fertilisation was assessed 16–18 hours after sperm injection. The morphology was assessed according to the Istanbul consensus criteria [for day 2/3 embryos (16)] or Gardner's criteria [for blastocysts (17)]. Progesterin (Utrogestan[®] 400 mg, Besins International, France) was used for luteal support. Pregnancy was defined as a serum hCG level >100 IU/L 14 days after embryo transfer.

Group Formation

After decoronization, oocyte morphology was evaluated under an inverted microscope (Nikon[®] 2000TU, France) equipped with Hoffman modulation contrast optics. The following oocyte morphological abnormalities were assessed and counted: diffuse cytoplasmic granularity, refractile bodies, vacuoles, sticky, or soft oocytes, large perivitelline space, and perivitelline debris. Depending on the proportion of their oocytes with one or more morphological abnormalities, patients were classified into an abnormal oocyte cohort (with

229 more than 50% of the oocytes presenting at least one
 230 abnormality) and a normal oocyte cohort (with 50% or less of
 231 oocytes presenting at least one abnormality). The 50% cut-off
 232 was chosen following the analysis of the distribution of oocyte
 233 abnormalities in the total cohort (**Figure 1**).
 234

235 **Preparation of Follicular Fluid Samples**

236 Following oocyte decoronization, each patient’s remaining FF
 237 samples were pooled. After the removal of cells by centrifugation
 238 at 2000 g for 10 minutes, the supernatant was recovered, stored
 239 at -20°C, and thawed immediately prior to analysis. FF samples
 240 that were contaminated with blood were excluded.
 241

242 **Hormone and Antithyroid Antibody Assays**

243 All hormone assays and antithyroid antibody screens were
 244 carried out as a single series at the end of the study. ELISAs
 245 were used to determine levels of TSH, fT3, fT4 (ELISA VISTA
 246 500™, Siemens Healthcare Diagnostics, Germany), 25OHD,
 247 anti-TPO antibodies (CENTAUR XP™, Siemens Healthcare
 248 Diagnostic, Germany), GH and IGF1 (IMMULITE 2000XPi,
 249 Siemens Healthcare Diagnostic, Germany). Anti-TG antibody
 250 titres were measured using an immunoradiometric assay
 251 (Immunotech®, Beckman Coulter, Czech Republic). The intra-
 252 and inter-assay coefficients of variation were below 10% in
 253 all assays.
 254

255 **Statistical Analysis**

256 All statistical analyses were performed with *pvalue.io* software
 257 (18). Data were expressed as the median [interquartile range] or
 258 the frequency (percentage). Intergroup differences groups were
 259 probed with a Mann-Whitney test (for quantitative variables) or
 260 a chi-squared test or Fisher’s exact test (for qualitative variables).
 261 The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$. As this
 262 pilot study was exploratory, no calculation of the sample size was
 263 carried out.
 264
 265
 266
 267
 268
 269

286 **RESULTS**

287 **Characteristics of the Study Population**
 288 **and ICSI Outcomes**

289 71 ICSI cycles were included in the study. 4 endometriotic
 290 patients were excluded as well as 8 ICSI with less than 4
 291 mature oocytes. 59 ICSI were analysed in total. There were no
 292 significant differences between the normal oocyte cohort (n=34
 293 cycles) and the abnormal oocyte cohort (n=25 cycles) with
 294 regard to age, BMI, current smoking status, ovarian reserve,
 295 and duration of infertility (**Table 1**).
 296

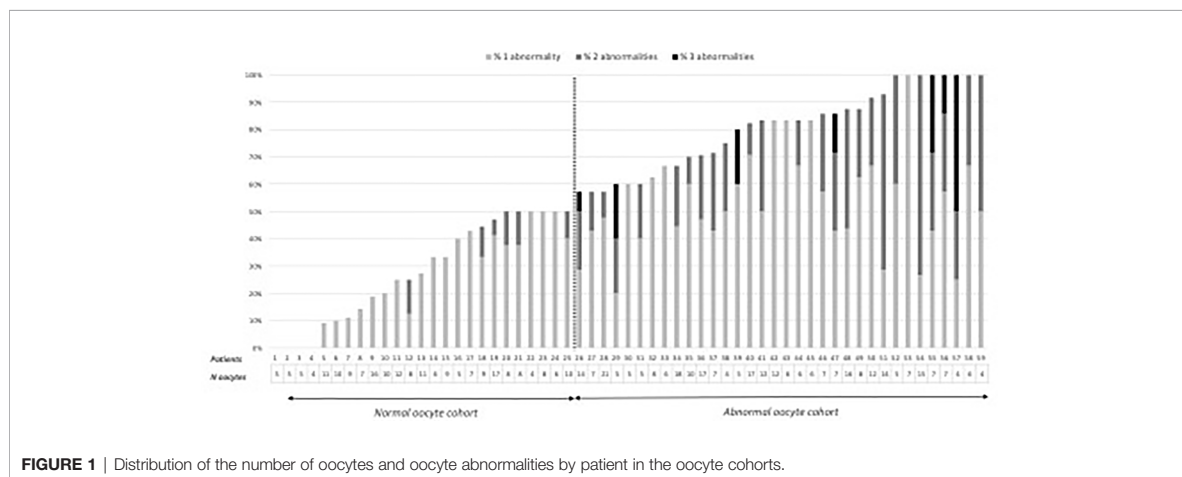
297 There were no differences between the normal and abnormal
 298 oocyte cohorts with regard to the ovarian response, ovarian
 299 stimulation characteristics, and ICSI outcomes (**Table 2**). The
 300 fertilisation rate was significantly lower in the abnormal oocyte
 301 cohort than in the normal oocyte cohort (65.5% vs. 80%,
 302 respectively, $p=0.012$). There were no intergroup differences in
 303 the embryonic development rate or the ICSI outcomes.
 304

305 **Distribution of Oocyte Morphological**
 306 **Abnormalities**

307 Of the 520 mature oocytes analysed, 307 (59%) presented one or
 308 more morphological abnormality. This proportion was 79.4%
 309 (n= 246) in the abnormal oocyte cohort and 29.0% (n=61) in the
 310 normal oocyte cohort. 217 oocytes (41.7%) had one abnormality,
 311 80 (15.4%) had two, and 10 (1.9%) had three or more (**Table 2**).
 312 Diffuse cytoplasmic granularity accounted for more than half the
 313 abnormalities (**Figure 2**).
 314

315 **Hormonal and Antithyroid Antibodies**
 316 **Assay in FF**

317 The follicular GH level was significantly higher in the normal
 318 oocyte cohort than in the abnormal oocyte cohort (4.98 vs. 2.75
 319 mIU/L, respectively; $p < 0.01$); the same was true for follicular
 320 levels of IGF1 (72.1 vs. 54.2 ng/mL, respectively; $p=0.05$)
 321 (**Table 3**). The intergroup differences in follicular levels of
 322 TSH, fT3, fT4, 25OHD and antithyroid antibodies were not
 323 statistically significant.
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342



Q11
 Q12

FIGURE 1 | Distribution of the number of oocytes and oocyte abnormalities by patient in the oocyte cohorts.

TABLE 1 | Characteristics of the study population, as a function of the oocyte cohort quality.

	Abnormal oocyte cohort (n = 34 cycles)	Normal oocyte cohort (n = 25 cycles)	p
Duration of infertility (years)	3.50 [3.00; 5.00]	4.00 [3.00; 4.00]	0.85
Characteristics of the women:			
- Age (years)	31.5 [29.0; 34.8]	30.0 [29.0; 34.0]	0.69
- BMI (kg/m ²)	23.0 [21.2; 27.0]	21.0 [20.0; 25.0]	0.096
- Current smoker	15%	20%	0.73
- POF	5.9%	8%	1
- PCOS	35%	24%	0.35
- FSH on day 3 (IU/L)	6.05 [4.82; 6.95]	5.60 [4.40; 7.00]	0.7
- AMH (ng/mL)	3.7 [2.8; 8.60]	3.30 [2.00; 4.50]	0.4
Characteristics of the men's sperm			
- Sperm concentration (M/ml)	38.2 [16.3; 79.3]	22.9 [12.0; 59.2]	0.19
- Progressive motility (%)	35.0 [30.0; 45.0]	27.5 [15.0; 40.0]	0.07

The data are expressed as the median [interquartile range] or the frequency (percentage).

BMI, body mass index; POF, premature ovarian failure; PCOS, polycystic ovary syndrome; FSH, follicle-stimulating hormone; AMH, anti-Müllerian hormone.

DISCUSSION

We have studied hormonal levels in FF during IVF and their association with oocytes quality. Our results show that levels of GH and IGF1 were higher in the normal oocyte cohort than in the abnormal oocyte cohort. At the opposite, there was no association with follicular levels of TSH, fT3, fT4, antithyroid antibodies, or 25OHD.

In our study, we found that the fertilisation rate was significantly lower in the abnormal cohort group, as also demonstrated by Setti et al.'s meta-analysis (19) and discussed recently by Camargos et al. (20). As was also the case in Setti et al.'s meta-analysis, we did not observe a significant difference in markers of embryonic development. It is noteworthy that the

literature data on other markers of oocyte quality impact are inconsistent. Some researchers reported poor cleavage rates (21, 22), embryonic development rates (23) and blastulation rates (24) with poor-quality embryos (21, 25). We found much the same pregnancy and live birth rates as in some studies (3, 26–28) but not in others (29, 30). These contrasting results for ICSI outcomes might be due to interstudy differences in the assessment of oocyte abnormalities and/or the impact of spermatozoid quality on embryo development.

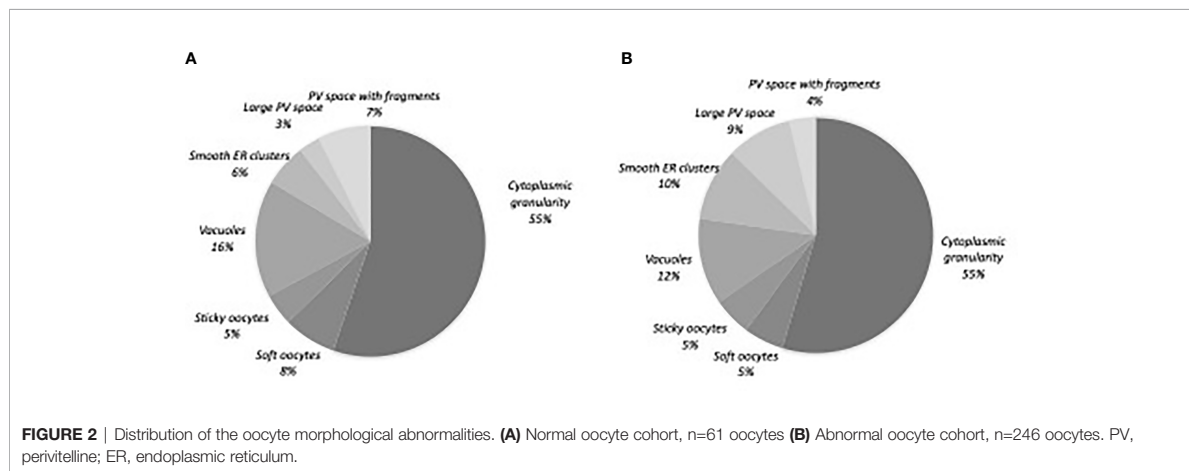
We found that 59% of the oocytes presented at least one morphological abnormality. This is in line with literature reports on COS for IVF, in which the proportion of abnormal oocytes ranges from 10% to 64% (1–5). Our data for the proportions of oocytes with one abnormality or two or more abnormalities were

TABLE 2 | The ovarian response, oocyte characteristics, and ICSI outcomes as a function of the oocyte cohort quality.

	Abnormal oocyte cohort (n = 34 cycles)	Normal oocyte cohort (n = 25 cycles)	p
COS parameters			
Ovarian stimulation protocol:			
- GnRH antagonist	9%91%	12%88%	
- Long GnRH agonist	91%	88%	0.69
Duration of COS (day)	11.5 [10.2; 13.0]	12.0 [10.0; 13.0]	0.66
Total dose of rFSH/HMG (IU)	1775 [1350; 2681]	1650 [1350; 2200]	0.67
E2 level on the hCG day (pg/ml)	2127 [1585; 2828]	2003 [1450; 2735]	0.94
Oocyte characteristics			
Number of oocytes retrieved	14.5 [9.25; 19.0]	12.0 [8.00; 15.0]	0.19
Number of oocytes injected	7.00 [6.00; 12.0]	8.00 [6.00; 10.0]	0.98
Proportion of matures oocytes	73.7 [59.5; 77.8]	75.0 [68.8; 83.3]	0.15
Proportion of abnormal oocytes	83.3 [67.5; 92.6]	27.3 [11.1; 47.1]	<0.001
Number of morphological abnormalities per oocyte:			
- One abnormality	52.8%	25.7%	<0.001
- Two abnormalities	23.9%	2.9%	
- Three or more abnormalities	3.2%	0%	
ICSI outcomes			
Fertilization rate	65.5 [44.7; 83.3]	80.0 [68.8; 88.9]	0.012
"Day 2 embryo" development rate	50.0 [25.0; 88.9]	62.5 [39.6; 77.5]	0.66
FET rate	65%	72%	0.55
Embryo cryopreservation rate	44%	40%	0.75
Pregnancy rate	45%	50%	0.77
Live birth rate	32%	44%	0.41

The data are expressed as the median [interquartile range] or the frequency (percentage).

GnRH, gonadotropin-releasing hormone; COS, control ovarian stimulation; rFSH, recombinant follicle-stimulating hormone; HMG, human menopausal gonadotropin; E2, oestradiol; hCG, human chorionic gonadotropin; FET, fresh embryo transfer.



within the ranges reported in the literature (41%–63%, and 15%–32%, respectively) (3, 21, 31, 32). We found that proportion of oocytes with two or more abnormalities was significantly greater in the abnormal oocyte cohort than in the normal oocyte cohort. The two cohorts were similar with regard to the distribution of the types of oocyte morphological abnormality. Cytoplasmic granulation accounted for over half of the morphological abnormalities; this proportion is higher than those reported in the literature, ranging from 5.4% and 24% (22, 32, 33). This high proportion in both cohort may be due to environmental factors as we already discussed in a previous study (34).

In our study, we observed an association between higher follicular levels of GH and IGF1 and oocyte quality. To the best of our knowledge, the correlation between follicular GH and IGF1 levels and oocyte cohort morphology has not previously been evaluated in IVF. Follicular GH and IGF1 levels appear to be associated with oocyte maturation: one study found a positive correlation between follicular GH and the number of oocytes collected (35) and another study found a positive correlation between follicular IGF1 and the number of mature oocytes (36). However, these associations were not found in other studies (37, 38). It has also been demonstrated that follicular GH and IGF1

levels are higher in follicles containing mature oocytes than in follicles containing atretic oocytes (39), as the density of IGF receptors in granulosa cells (40). With regard to other IVF parameters, some studies (41, 42) but not others (38, 43) have found that follicular GH and IGF1 levels were positively correlated with the fertilisation rate. Overall, higher follicular GH and IGF1 levels appear to be associated with better oocyte competency in IVF. This hypothesis is also supported by the beneficial effect of adjuvant GH treatment on IVF outcomes. Indeed, many studies of GH treatment have reported a better ovarian response to stimulation, greater numbers of oocytes and embryos, and higher pregnancy and live birth rates in poor responders (44). Furthermore, during *in vitro* maturation of human oocytes, the addition of IGF1 to the culture medium is associated with a greater number of mature oocytes (45, 46) and a lower proportion of oocytes with morphological abnormalities (46). However, the association that we highlight does not allow us to conclude whether lower levels of IGF1 would be a cause or a consequence of a poorer oocyte quality. Current knowledge on the role of somatotrophic axis on ovarian function reinforce the hypothesis of the beneficial effect of GH and IGF1 on oocyte competency. In humans, GH is involved in (i) initiating and

Q14 **TABLE 3 |** Follicular hormone levels and prevalence of antithyroid antibodies in the FF, as a function of oocyte cohort quality.

	Abnormal oocyte cohort (n = 34 cycles)	Normal oocyte cohort (n = 25 cycles)	p
Somatotropic axis:			
- GH (mIU/L)	2.75 [1.95; 4.24]	4.98 [2.84; 7.05]	<0.01
- IGF1 (ng/mL)	54.2 [35.1; 84.6]	72.1 [62.1; 95.6]	0.05
25OHD (ng/ml) ^a	24.5 [18.1; 29.6]	22.8 [14.5; 33.7]	0.98
Thyroid function and immunity			
- TSH (mIU/l)	1.12 [0.735; 1.73]	1.51 [0.970; 2.00]	0.3
- fT3 (pmol/l)	3.59 [3.00; 4.2]	3.75 [3.30; 4.17]	0.91
- fT4 (ng/dl)	1.09 [1.04; 1.18]	1.15 [1.05; 1.22]	0.42
- Anti-TPO antibodies ^b	3.3%	17%	0.19
- Anti-TG antibodies ^c	0%	17%	0.08

The data are expressed as the median [interquartile range] or the frequency (percentage).

GH, growth hormone; IGF1, insulin-like growth factor 1; 25OHD, 25-hydroxy vitamin D; TSH, thyroid-stimulating hormone; fT3, free triiodothyronine; fT4, free thyroxine; TPO, thyroperoxidase; TG, thyroglobulin.

Missing data: ^an=7, ^bn=17, ^cn=18.

sustaining the development of primordial follicles into preovulatory human follicles, (ii) cytoplasmic and nuclear maturation in the oocyte, and (iii) cumulus cell expansion (47, 48). In addition to these direct effects on oocyte development, adjuvant treatment with GH in IVF is associated with lower FF levels of oxidative stress markers (49). Furthermore, systemic and/or local IGF1 stimulates the proliferation, differentiation and activity of granulosa cells (48). GH and IGF1 are also synergic with gonadotropins, as they improve the ovary's responsiveness to FSH and LH by increasing expression levels of the cognate receptors (50, 51). Our design study using a pool of FF for each patient does not allow us to extrapolate the pathophysiological impact of the somatotrophic axis on FF composition and oocyte competency for each individual follicle.

Given that the vitamin D receptor is detected in stromal, granulosa and thecal ovarian cells (52, 53) and that the concentration of 25OHD in FF is positively correlated with the serum (54), we hypothesised that the FF 25OHD level would be associated with oocyte cohort quality. However, we did not find any evidence of such a relationship. Although the possible association with oocyte morphology has not previously been assessed, other IVF parameters have been evaluated in the literature; there was no difference in the number of oocytes collected (55, 56) or in the oocyte maturation rate as a function of the follicular 25OHD level (56). Conversely, some researchers have observed a negative correlation between the follicular 25OHD level and the fertilisation rate (57). It is noteworthy that supplementation with the active form of vitamin D (i.e. 1-25OHD) increases granulosa cell proliferation and differentiation and oocyte maturation (13, 14).

In our study population of euthyroid women, the follicular TSH, fT3, fT4 and antithyroid antibody levels were similar in the normal and abnormal oocyte cohorts. In the literature, only Cai et al. studied the link between follicular levels of TSH/TH and IVF parameters. They only observed a positive correlation between follicular TSH level and embryo quality. However, oocyte morphology was not assessed in this study (58). The fact that TSH receptors are expressed throughout folliculogenesis (59) suggests that this hormone has a major role in oocyte development independently of THs, since the latter are not synthesised locally. fT3 improves granulosa cell proliferation and differentiation (9), and THs inhibit granulosa cell apoptosis (10). The positive correlation between follicular and serum hormone levels suggests the presence of passive transport into the follicular compartment (58). However, since human granulosa cells and the superficial epithelial cells of the ovary have been shown to express deiodases 2 and 3 (59, 60), the correlation might indicate the conversion of T4 to active T3 or inactive T3r. This conversion might be influenced by follicular action TSH on deiodases.

Antithyroid antibodies are detected in about 10% of women of childbearing age; we found a similar proportion in the present study. The difference in the prevalence of antithyroid antibodies between the abnormal and normal oocyte cohorts was not statistically significant. This finding is in line with most of the literature data; in general, no differences were observed in terms

of the number of oocytes collected (61) or [with the exception of one study (62)] the fertilisation rate (58, 61). The follicular and serum concentration levels of antithyroid antibodies are positively correlated (58); this is suggestive of passive transport, and so the antithyroid antibodies present in the FF might simply be "bystanders".

One of the limitations of our study is a small population. It would be valuable to confirm our present findings (i.e. an association between follicular GH and IGF1 levels and oocyte cohort quality) in a larger cohort. Studying each follicle individually could also be an important point to investigate relationships between hormone concentrations and each type of oocyte morphological abnormality. Furthermore, the assessment of oocyte morphological abnormalities in women with hormonal deficit might be informative. Indeed, we have observed a dramatic reduction in the number of oocyte morphological abnormalities after GH replacement therapy in patient with GH deficiency (63). However, this type of study would not be ethically possible in women with hypothyroidism because the establishment of euthyroidism in pregnancy is clinically necessary. Experiments in animal models might be informative.

CONCLUSION

This pilot cohort study is the first who evaluated the association between FF hormone concentrations and oocyte cohort quality. Follicular levels of GH and IGF1 were significantly higher in a normal oocyte cohort than in an abnormal oocyte cohort. However, we did not observe an association with follicular levels of TSH, fT3, fT4, 25OHD, or antithyroid antibodies. The GH/IGF1 system appears to be important for oocyte development and competency. Further characterisation of these hormones' actions is now necessary.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by CPP Amiens, France (reference: RCB 2011-A00634-37). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FS, RC, AD, and RD contributed to conception and design of the study. MS carried out the biological analyzes of follicular fluid.

DB and EL carried out the morphological evaluation of oocytes. MK allowed proofreading of English. FS wrote the first draft of the manuscript. FS, MS, DB, and EL wrote sections of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

REFERENCES

- Ebner T, Moser M, Tews G. Is Oocyte Morphology Prognostic of Embryo Developmental Potential After ICSI? *Reprod BioMed Online* (2006) 12(4):507–12. doi: 10.1016/S1472-6483(10)62006-8
- Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, et al. Significance of Metaphase II Human Oocyte Morphology on ICSI Outcome. *Fertil Steril* (2008) 90(5):1692–700. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.09.024
- Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte Morphology Does Not Affect Fertilization Rate, Embryo Quality and Implantation Rate After Intracytoplasmic Sperm Injection. *Hum Reprod Oxf Engl* (1998) 13(12):3431–3. doi: 10.1093/humrep/13.12.3431
- Sousa M, Cunha M, Silva J, Oliveira E, Pinho MJ, Almeida C, et al. Ultrastructural and Cytogenetic Analyses of Mature Human Oocyte Dysmorphisms With Respect to Clinical Outcomes. *J Assist Reprod Genet* (2016) 33(8):1041–57. doi: 10.1007/s10815-016-0739-8
- de Cássia S Figueira R, de Almeida Ferreira Braga DP, Semião-Francisco L, Madaschi C, Iaconelli A, Borges E. Metaphase II Human Oocyte Morphology: Contributing Factors and Effects on Fertilization Potential and Embryo Developmental Ability in ICSI Cycles. *Fertil Steril* (2010) 94(3):1115–7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.11.039
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. *Biol Reprod* (2010) 82(6):1021–9. doi: 10.1095/biolreprod.109.082941
- Chandrashekar V, Zaczek D, Bartke A. The Consequences of Altered Somatotrophic System on Reproduction. *Biol Reprod* (2004) 71(1):17–27. doi: 10.1095/biolreprod.103.027060
- Karamouti M, Kollia P, Kallitsaris A, Vamvakopoulos N, Kollios G, Messinis IE. Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor I, and Leptin Interaction in Human Cultured Lutein Granulosa Cells Steroidogenesis. *Fertil Steril* (2008) 90(4 Suppl):1444–50. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.08.076
- Goldman S, Dirnfeld M, Abramovici H, Kraiem Z. Triiodothyronine and Follicle-Stimulating Hormone, Alone and Additively Together, Stimulate Production of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 in Cultured Human Luteinized Granulosa Cells. *J Clin Endocrinol Metab* (1997) 82(6):1869–73. doi: 10.1210/jcem.82.6.3997
- Di Paolo V, Mangialardo C, Zacà C, Barberi M, Sereni E, Borini A, et al. Thyroid Hormones T3 and T4 Regulate Human Luteinized Granulosa Cells, Counteracting Apoptosis and Promoting Cell Survival. *J Endocrinol Invest* (2020) 43(6):821–31. doi: 10.1007/s40618-019-01169-5
- Datta M, Roy P, Banerjee J, Bhattacharya S. Thyroid Hormone Stimulates Progesterone Release From Human Luteal Cells by Generating a Proteinaceous Factor. *J Endocrinol* (1998) 158(3):319–25. doi: 10.1677/joe.0.1580319
- Wakim AN, Polizzotto SL, Burholt DR. Augmentation by Thyroxine of Human Granulosa Cell Gonadotrophin-Induced Steroidogenesis. *Hum Reprod Oxf Engl* (1995) 10(11):2845–8. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a135805
- Xu J, Lawson MS, Xu F, Du Y, Tkachenko OY, Bishop CV, et al. Vitamin D3 Regulates Follicular Development and Intrafollicular Vitamin D Biosynthesis and Signaling in the Primate Ovary. *Front Physiol* (2018) 9:1600. doi: 10.3389/fphys.2018.01600
- Xu J, Hennebold JD, Seifer DB. Direct Vitamin D3 Actions on Rhesus Macaque Follicles in Three-Dimensional Culture: Assessment of Follicle Survival, Growth, Steroid, and Antimüllerian Hormone Production. *Fertil Steril* (2016) 106(7):1815–20.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.08.037
- Merhi Z, Doswell A, Krebs K, Cipolla M. Vitamin D Alters Genes Involved in Follicular Development and Steroidogenesis in Human Cumulus Granulosa Cells. *J Clin Endocrinol Metab* (2014) 99(6):E1137–1145. doi: 10.1210/jc.2013-4161
- Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul Consensus Workshop on Embryo Assessment: Proceedings of an Expert Meeting. *Hum Reprod Oxf Engl* (2011) 26(6):1270–83. doi: 10.1016/j.rbmo.2011.02.001
- Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and Transfer of Human Blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol* (1999) 11(3):307–11. doi: 10.1097/00001703-199906000-00013
- Medistica. *Pvalue.io, a Graphic User Interface to the R Statistical Analysis Software for Scientific Medical Publications* (2019). Available at: <https://www.pvalue.io>.
- Setti AS, Figueira RCS, Braga DPAF, Colturato SS, Iaconelli A, Borges E. Relationship Between Oocyte Abnormal Morphology and Intracytoplasmic Sperm Injection Outcomes: A Meta-Analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (2011) 159(2):364–70. doi: 10.1016/j.ejogrb.2011.07.031
- Camargos M das GRS, Lobach VNM, Pereira FAN, Lemos CNCD, Reis FM, Camargos AF. Computer-Assisted Oocyte Morphometry Before ICSI: Correlation of Oocyte Measurements With Fertilization and Embryo Development. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif* (2012) 19(3):306–11. doi: 10.1093/humrep/12.8.1750
- Mikkelsen AL, Lindenberg S. Morphology of *in-Vitro* Matured Oocytes: Impact on Fertility Potential and Embryo Quality. *Hum Reprod Oxf Engl* (2001) 16(8):1714–8. doi: 10.1093/humrep/16.8.1714
- Faramarzi A, Khalili MA, Ashourzadeh S. Oocyte Morphology and Embryo Morphokinetics in an Intra-Cytoplasmic Sperm Injection Programme. Is There a Relationship? *Zygote Camb Engl* (2017) 25(2):190–6. doi: 10.1017/S0967199417000041
- Xia P. Intracytoplasmic Sperm Injection: Correlation of Oocyte Grade Based on Polar Body, Perivitelline Space and Cytoplasmic Inclusions With Fertilization Rate and Embryo Quality. *Hum Reprod Oxf Engl* (1997) 12(8):1750–5. doi: 10.1093/humrep/12.8.1750
- Yakin K, Balaban B, Isiklar A, Urman B. Oocyte Dysmorphism is Not Associated With Aneuploidy in the Developing Embryo. *Fertil Steril* (2007) 88(4):811–6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.12.031
- Suppinyopong S, Choavaratana R, Karavakul C. Correlation of Oocyte Morphology With Fertilization Rate and Embryo Quality After Intracytoplasmic Sperm Injection. *J Med Assoc Thai Chotmaihet Thangphaet* (2000) 83(6):627–32.
- Alikani M, Palermo G, Adler A, Bertoli M, Blake M, Cohen J. Intracytoplasmic Sperm Injection in Dysmorphic Human Oocytes. *Zygote Camb Engl* (1995) 3(4):283–8. doi: 10.1017/S0967199400002707
- Chamayou S, Ragolia C, Alecci C, Storaci G, Maglia E, Russo E, et al. Meiotic Spindle Presence and Oocyte Morphology do Not Predict Clinical ICSI Outcomes: A Study of 967 Transferred Embryos. *Reprod BioMed Online* (2006) 13(5):661–7. doi: 10.1016/S1472-6483(10)60656-6
- Ashrafi M, Karimian L, Eftekhari-Yazdi P, Hasani F, Arabipoor A, Bahmanabadi A, et al. Effect of Oocyte Dysmorphisms on Intracytoplasmic Sperm Injection Cycle Outcomes in Normal Ovarian Responders. *J Obstet Gynaecol Res* (2015) 41(12):1912–20. doi: 10.1111/jog.12818
- Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte Morphology Predicts Outcome of Intracytoplasmic Sperm Injection. *Hum Reprod Oxf Engl* (1997) 12(6):1267–70. doi: 10.1093/humrep/12.6.1267
- Figueira R de CS, Braga DPAF, Semião-Francisco L, Iaconelli A, Borges E. Oocyte Yield and Dysmorphisms as Indicators of Biological Efficiency in Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles. *Hum Fertil Camb Engl* (2011) 14(1):41–7.
- De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte Morphology Does Not Correlate With Fertilization Rate and Embryo Quality After Intracytoplasmic Sperm Injection. *Hum Reprod Oxf Engl* (1996) 11(3):595–7. doi: 10.1093/HUMREP/11.3.595
- Plachot M, Selva J, Wolf JP, Bastit P, de Mouzon J. Consequences of Oocyte Dysmorphism on the Fertilization Rate and Embryo Development After

- 799 Intracytoplasmic Sperm Injection. A Prospective Multicenter Study. *Gynecol*
800 *Obstet Fertil* (2002) 30(10):772–9. doi: 10.1016/S1297-9589(02)00437-X
- 801 33. Tulay P, Arslan H, Buran A, Koprulu Y. Assessment of Successful Pregnancy
802 Using Granular Oocytes in ICSI Treatments. *Zygote Camb Engl* (2019) 27
803 (2):97–100. doi: 10.1017/S096719941900008X
- 804 34. Merviel P, Cabry R, Chardon K, Haraux E, Scheffler F, Mansouri N-B, et al.
805 Impact of Oocytes With CLCG on ICSI Outcomes and Their Potential
806 Relation to Pesticide Exposure. *J Ovarian Res* (2017) 10(1):42. doi: 10.1186/
807 s13048-017-0335-2
- 808 35. Potashnik G, Lunenfeld E, Shwartz I, Glezerman M, Roberts CT, LeRoith D,
809 et al. Endogenous Plasma Growth Hormone and the Occurrence of
810 Pregnancies in Patients Undergoing *in-Vitro* Fertilization and Embryo
811 Transfer With Ovarian Stimulation. *Hum Reprod Oxf Engl* (1995) 10
812 (5):1065–9. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136095
- 813 36. Pellegrini S, Fuzzi B, Pratesi S, Mannelli M, Criscuoli L, Messeri G, et al. *In-*
814 *Vivo* Studies on Ovarian Insulin-Like Growth Factor I Concentrations in
815 Human Preovulatory Follicles and Human Ovarian Circulation. *Hum Reprod*
816 *Oxf Engl* (1995) 10(6):1341–5. doi: 10.1093/HUMREP/10.6.1341
- 817 37. Geisthoevel F, Moretti-Rojas IM, Rojas FJ, Asch RH. Immunoreactive Insulin-
818 Like Growth Factor I in Human Follicular Fluid. *Hum Reprod Oxf Engl* (1989)
819 4(1):35–8. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136841
- 820 38. Rabinovici J, Dandekar P, Angle MJ, Rosenthal S, Martin MC. Insulin-Like
821 Growth Factor I (IGF-I) Levels in Follicular Fluid From Human Preovulatory
822 Follicles: Correlation With Serum IGF-I Levels. *Fertil Steril* (1990) 54(3):428–
823 33. doi: 10.1016/S0015-0282(16)53756-X
- 824 39. Artini PG, Battaglia C, D'Ambrogio G, Barreca A, Droghini F, Volpe A, et al.
825 Relationship Between Human Oocyte Maturity, Fertilization and Follicular
826 Fluid Growth Factors. *Hum Reprod Oxf Engl* (1994) 9(5):902–6. doi: 10.1093/
827 oxfordjournals.humrep.a138614
- 828 40. Kwon H, Choi D-H, Bae J-H, Kim J-H, Kim Y-S. mRNA Expression Pattern of
829 Insulin-Like Growth Factor Components of Granulosa Cells and Cumulus
830 Cells in Women With and Without Polycystic Ovary Syndrome According to
831 Oocyte Maturity. *Fertil Steril* (2010) 94(6):2417–20. doi: 10.1016/
832 j.fertnstert.2010.03.053
- 833 41. Jimena P, Castilla JA, Peran F, Molina R, Ramirez JP, Acebal M, et al. Insulin
834 and Insulin-Like Growth Factor I in Follicular Fluid After Induction of
835 Ovulation in Women Undergoing *In Vitro* Fertilization. *J Reprod Fertil*
836 (1992) 96(2):641–7. doi: 10.1530/jrf.0.0960641
- 837 42. Mendoza C, Cremades N, Ruiz-Requena E, Martinez F, Ortega E, Bernabeu S,
838 et al. Relationship Between Fertilization Results After Intracytoplasmic Sperm
839 Injection, and Intrafollicular Steroid, Pituitary Hormone and Cytokine
840 Concentrations. *Hum Reprod Oxf Engl* (1999) 14(3):628–35. doi: 10.1093/
841 humrep/14.3.628
- 842 43. Oosterhuis GJ, Vermes I, Lambalk CB, Michelsen HW, Schoemaker J.
843 Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I and IGF Binding Protein-3
844 Concentrations in Fluid From Human Stimulated Follicles. *Hum Reprod*
845 *Oxf Engl* (1998) 13(2):285–9. doi: 10.1093/humrep/13.2.285
- 846 44. Duffy JM, Ahmad G, Mohiyiddin L, Nardo LG, Watson A. Growth
847 Hormone for *In Vitro* Fertilization. *Cochrane Database Syst Rev* (2010) 1):
848 CD000099. doi: 10.1002/14651858.CD000099.pub3
- 849 45. Gómez E, Tarín JJ, Pellicer A. Oocyte Maturation in Humans: The Role of
850 Gonadotropins and Growth Factors. *Fertil Steril* (1993) 60(1):40–6.
- 851 46. Yu Y, Yan J, Li M, Yan L, Zhao Y, Lian Y, et al. Effects of Combined Epidermal
852 Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Insulin-Like Growth
853 Factor-1 on Human Oocyte Maturation and Early Fertilized and Cloned
854 Embryo Development. *Hum Reprod Oxf Engl* (2012) 27(7):2146–59.
855 doi: 10.1093/humrep/des099
- 856 47. Bergh C, Carlström K, Selleskog U, Hillensjö T. Effect of Growth Hormone on
857 Follicular Fluid Androgen Levels in Patients Treated With Gonadotropins
858 Before *In Vitro* Fertilization. *Eur J Endocrinol* (1996) 134(2):190–6.
859 doi: 10.1530/eje.0.1340190
- 860 48. Silva JRV, Figueiredo JR, van den Hurk R. Involvement of Growth Hormone
861 (GH) and Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Ovarian
862 Folliculogenesis. *Theriogenology* (2009) 71(8):1193–208. doi: 10.1016/
863 j.theriogenology.2008.12.015
- 864 49. Gong Y, Luo S, Fan P, Jin S, Zhu H, Deng T, et al. Growth Hormone Alleviates
865 Oxidative Stress and Improves Oocyte Quality in Chinese Women With
866 Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized Controlled Trial. *Sci Rep* (2020)
867 10. doi: 10.1038/s41598-020-75107-4
- 868 50. Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, Arfuso F, Dharmarajan A. Growth
869 Hormone During *In Vitro* Fertilization in Older Women Modulates the
870 Density of Receptors in Granulosa Cells, With Improved Pregnancy
871 Outcomes. *Fertil Steril* (2018) 110(7):1298–310. doi: 10.1016/
872 j.fertnstert.2018.08.018
- 873 51. Stocco C, Baumgarten SC, Armouti M, Fierro MA, Winston NJ, Scoccia B,
874 et al. Genome-Wide Interactions Between FSH and Insulin-Like Growth
875 Factors in the Regulation of Human Granulosa Cell Differentiation. *Hum*
876 *Reprod Oxf Engl* (2017) 32(4):905–14. doi: 10.1093/humrep/dex002
- 877 52. Parikh G, Varadinova M, Suwandhi P, Araki T, Rosenwaks Z, Poretsky L, et al.
878 Vitamin D Regulates Steroidogenesis and Insulin-Like Growth Factor Binding
879 Protein-1 (IGFBP-1) Production in Human Ovarian Cells. *Horm Metab Res*
880 *Horm Stoffwechselforschung Horm Metab* (2010) 42(10):754–7. doi: 10.1055/s-
881 0030-1262837
- 882 53. Thill M, Becker S, Fischer D, Cordes T, Hornemann A, Diedrich K, et al.
883 Expression of Prostaglandin Metabolising Enzymes COX-2 and 15-PGDH
884 and VDR in Human Granulosa Cells. *Anticancer Res* (2009) 29(9):3611–8.
- 885 54. Potashnik G, Lunenfeld E, Levitas E, Itskovitz J, Albutiano S, Yankowitz N,
886 et al. The Relationship Between Endogenous Oestradiol and Vitamin D3
887 Metabolites in Serum and Follicular Fluid During Ovarian Stimulation for *in-*
888 *Vitro* Fertilization and Embryo Transfer. *Hum Reprod Oxf Engl* (1992) 7
889 (10):1357–60. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137573
- 890 55. Anifandis GM, Dafopoulos K, Messini CI, Chalvatzas N, Liakos N, Pournaras
891 S, et al. Prognostic Value of Follicular Fluid 25-OH Vitamin D and Glucose
892 Levels in the IVF Outcome. *Reprod Biol Endocrinol RBE* (2010) 8:91.
893 doi: 10.1186/1477-7827-8-91
- 894 56. Armanz A, De Munck N, El Khatib I, Bayram A, Abdala A, Melado L, et al.
895 Vitamin D in Follicular Fluid Correlates With the Euploid Status of
896 Blastocysts in a Vitamin D Deficient Population. *Front Endocrinol* (2020)
897 11:609524. doi: 10.3389/fendo.2020.609524
- 898 57. Ciepela P, Dulęba AJ, Kowalczyk E, Chelstowski K, Kurzawa R. Vitamin D
899 as a Follicular Marker of Human Oocyte Quality and a Serum Marker of *In*
900 *Vitro* Fertilization Outcome. *J Assist Reprod Genet* (2018) 35(7):1265–76.
901 doi: 10.1007/s10815-018-1179-4
- 902 58. Cai YY, Lin N, Zhong LP, Duan HJ, Dong YH, Wu Z, et al. Serum and
903 Follicular Fluid Thyroid Hormone Levels and Assisted Reproductive
904 Technology Outcomes. *Reprod Biol Endocrinol RBE* (2019) 17(1):90.
905 doi: 10.1186/s12958-019-0529-0
- 906 59. Aghajanova L, Lindeberg M, Carlsson IB, Stavreus-Evers A, Zhang P, Scott JE,
907 et al. Receptors for Thyroid-Stimulating Hormone and Thyroid Hormones in
908 Human Ovarian Tissue. *Reprod BioMed Online* (2009) 18(3):337–47.
909 doi: 10.1016/S1472-6483(10)60091-0
- 910 60. Rae MT, Gubbay O, Kostogiannou A, Price D, Critchley HOD, Hillier SG.
911 Thyroid Hormone Signaling in Human Ovarian Surface Epithelial Cells. *J Clin*
912 *Endocrinol Metab* (2007) 92(1):322–7. doi: 10.1210/jc.2006-1522
- 913 61. Medenica S, Garalejić E, Arsic B, Medjo B, Bojovic Jovic D, Abazovic D, et al.
914 Follicular Fluid Thyroid Autoantibodies, Thyrotropin, Free Thyroxine Levels
915 and Assisted Reproductive Technology Outcome. *PLoS One* (2018) 13(10):
916 e0206652. doi: 10.1371/journal.pone.0206652
- 917 62. Monteleone P, Parrini D, Faviana P, Carletti E, Casarosa E, Uccelli A, et al.
918 Female Infertility Related to Thyroid Autoimmunity: The Ovarian Follicle
919 Hypothesis. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989 (2011) 66(2):108–14.
920 doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00961.x
- 921 63. Scheffler F, Cabry R, Soye M, Copin H, Khalifa MB, Devaux A, et al. Growth
922 Hormone Replacement Improved Oocyte Quality in a Patient With
923 Hypopituitarism: A Study of Follicular Fluid. *Ann Endocrinol* (2021) S0003-
924 4266(21). doi: 10.1016/j.ando.2021.05.003

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. Q21

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in

913	this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or	<i>distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY).</i>	970
914	endorsed by the publisher.	<i>The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the</i>	971
915		<i>original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original</i>	972
916	Copyright © 2021 Scheffler, Vandecandelaere, Soyez, Bosquet, Lefranc, Copin,	<i>publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No</i>	973
917	Devaux, Ben Khalifa, Cabry and Desailoud. This is an open-access article	<i>use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.</i>	974
918			975
919			976
920			977
921			978
922			979
923			980
924			981
925			982
926			983
927			984
928			985
929			986
930			987
931			988
932			989
933			990
934			991
935			992
936			993
937			994
938			995
939			996
940			997
941			998
942			999
943			1000
944			1001
945			1002
946			1003
947			1004
948			1005
949			1006
950			1007
951			1008
952			1009
953			1010
954			1011
955			1012
956			1013
957			1014
958			1015
959			1016
960			1017
961			1018
962			1019
963			1020
964			1021
965			1022
966			1023
967			1024
968			1025
969			1026

Partie 6

Analyse 3 : Étude des issues de tentatives de FIV+/-ICSI

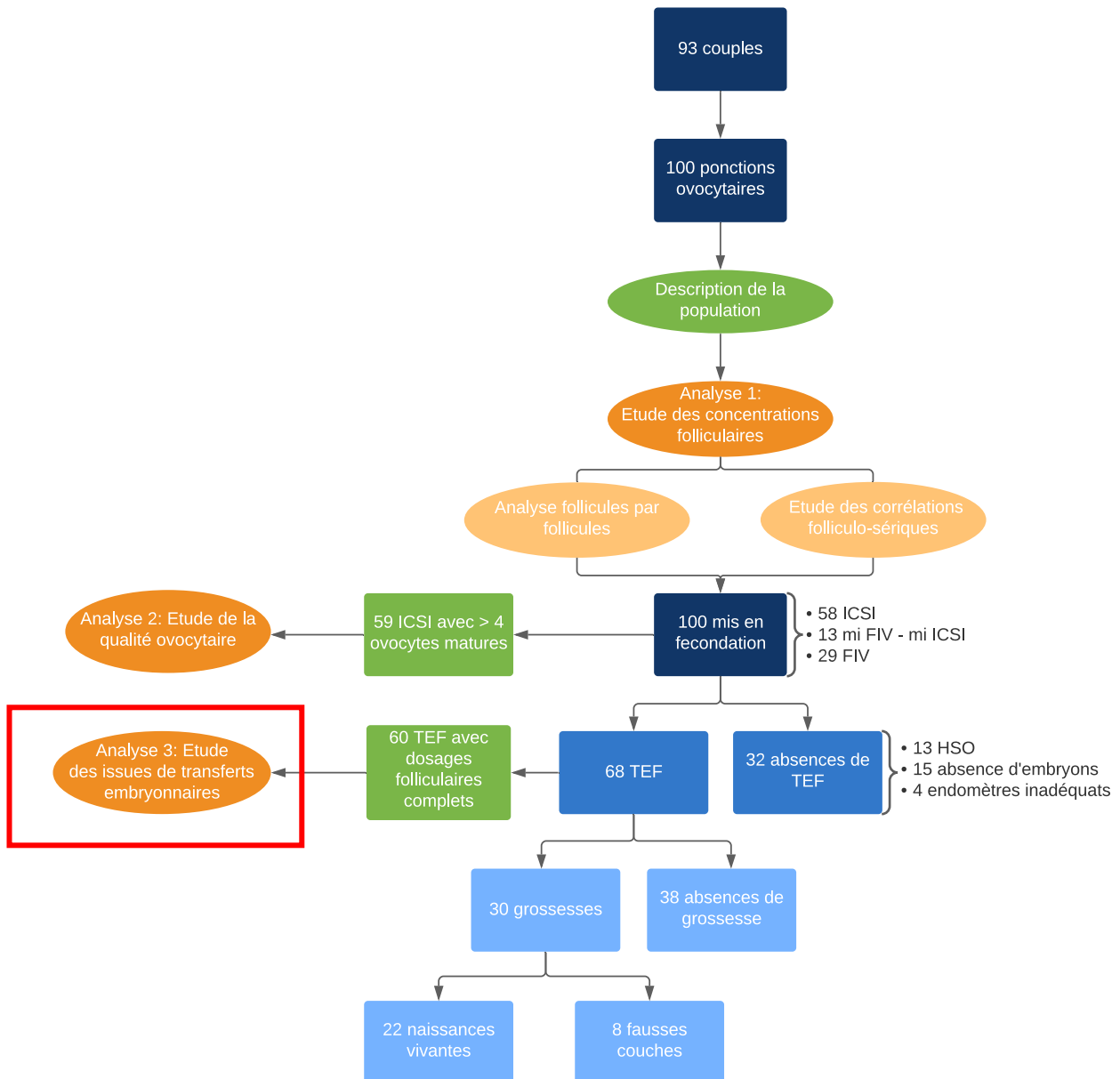


Figure 2: Flow chart de l'étude

I. Introduction

Dans cette dernière partie, nous avons recherché une association entre les issues de tentatives en FIV+/-ICSI et les concentrations folliculaires et sériques en TSH, T4L, T3L, GH, IGF1, 25(OH)D, et la présence des ACAT. L'utérus étant un des acteurs indispensables à l'implantation embryonnaire, nous débutons cette partie par une brève revue de littérature sur le rôle potentiel des axes thyroïdienne et somatotrope et de la vitamine D sur le fonctionnement utérin.

A. Axe thyroïdienne

1. Expression utérine des récepteurs

Les récepteurs à la TSH sont exprimés au niveau des cellules endométriales utérines, leur expression est plus importante au moment de la fenêtre d'implantation (460). Les récepteurs TR α 1, TR α 2 et TR β 1 sont aussi exprimés au niveau des cellules endométriales, leur expression est plus importante au moment de la fenêtre d'implantation (J+6 -J+9 après le pic de LH) (460). Les DOI 2 et 3 sont détectées dans l'endomètre tout au long du cycle (35,460).

2. Axe thyroïdienne et physiologie utérine

Très peu d'études ont été menées pour évaluer l'effet des HT et de la TSH sur le fonctionnement utérin. L'excès en HT chez le rat adulte entraîne un endomètre plus fin. L'administration de T4 réduit la captation des œstrogènes endométriaux (461) et une réponse endométriale moindre aux œstrogènes a été observée chez le rat hyperthyroïdien (462).

B. Axe somatotrope

1. Détection hormonale et expression des récepteurs

La GH (30) et son récepteur sont présents au niveau de l'utérus (463). Les GHR sont exprimés dans le myomètre (464), sur les cellules glandulaires endométriales pendant la phase lutéale moyenne et tardive, mais pas pendant la phase proliférative (465). On ne les observe pas sur les cellules stromales de l'endomètre (465).

Les IGF1 et 2 sont détectés au niveau des cellules endométriales stromales, mais pas au niveau des cellules épithéliales (466,467). L'IGF1 est plus abondant pendant la phase

proliférative et le début de la phase sécrétoire, alors que l'IGF2 est prédominant à partir du milieu de la phase sécrétoire (466,468,469).

Les récepteurs à l'IGF1/2 sont exprimés dans l'utérus (104), plus précisément dans les cellules endométriales stromales et épithéliales où ils sont le plus exprimés (466). Ils sont mis en évidence pendant la phase proliférative et sécrétoire (468) sans variation de leur expression en fonction du cycle (466).

Les IGFBP1, 2, 3, 4, 5 et 6 sont détectées dans les cellules stromales endométriales (466,469–473). L'IGFBP1 est détectée majoritairement pendant la phase sécrétoire avec distribution plus importante dans les cellules stromales et épithéliales (466,469). L'IGFBP5 est aussi plus abondante pendant la phase proliférative alors que la production de toutes les autres IGFBPs augmente pendant la phase sécrétoire (466,469). L'IGFBP3 est plutôt localisée dans les capillaires endométriaux et augmente pendant la phase sécrétoire secondairement à l'intense vascularisation des glandes endométriales pendant cette phase (466).

2. Axe somatotrope et physiologie utérine

L'utérus est aussi un tissu cible de la GH. Chez le rat, l'ajout de GH stimule la prolifération cellulaire endométriale (474,475). Chez la brebis, elle augmente le poids de l'endomètre et du myomètre (476), mais ne modifie pas l'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone (477). Il est observé que des souris GHR-KO ont moins de sites d'implantation embryonnaire (205).

Chez l'humain, la GH semble aussi avoir un effet prolifératif sur l'utérus. En effet, l'incidence des léiomyomes est plus importante chez les patientes acromégales (478). Par ailleurs, il a été démontré que les patientes présentant un GHD isolé ou un hypopituitarisme avaient de plus petits utérus, l'atteinte utérine étant plus marquée en cas d'hypopituitarisme (479,480). L'ajout de GH dans des cultures cellulaires endométriales humaines augmente la prolifération endométriale, la vascularisation et la régulation positive de gènes impliqués dans la réceptivité utérine tels que le VEGF ou l'intégrine bêta 3 (426). Cependant, l'administration de GH en FIV à des femmes avec GHD ne semble pas augmenter l'épaisseur endométriale (407). Il existerait une relation entre l'expression de GH et le taux de progestérone. En effet, on observe que les patientes présentant une insuffisance lutéale et un retard de maturation endométriale ont une baisse significative de l'expression de la GH dans les cellules endométriales (465).

Par ailleurs, une régulation par les stéroïdes sexuels semble être observée. Chez le rat, l'ajout d'œstradiol dans des cultures de cellules endométriales augmente l'expression de l'IGF1 et de son récepteur (481–483), mais n'a pas d'effet sur l'expression du GHR (484). L'ajout d'œstradiol ou de progestérone augmente l'expression des IGFBP2 chez le rat (473) et des IGFBP2 et 3 utérines chez l'humain (472).

C. Vitamine D

1. Détection hormonale et expression des récepteurs

Le VDR est retrouvé au sein des cellules stromales de l'endomètre et dans le myomètre pendant toutes les phases du cycle (485–487). La 1α hydroxylase est retrouvée au niveau de cellules de l'endomètre (485).

2. Vitamine D et physiologie utérine

Peu d'études ont été menées pour évaluer le rôle de la vitamine D sur le fonctionnement utérin. On observe une hypoplasie utérine chez la souris KO pour le VDR (330). Chez l'humain, la $1,25(\text{OH})\text{D}$ se lie au VDR dans l'endomètre pour réguler les gènes cibles tels que la calbindine, l'ostéopontine et HOX10A, gènes essentiels à l'implantation et à la placentation de l'embryon (488,489). La $1,25(\text{OH})\text{D}$ jouerait un rôle immunosuppresseur en modulant l'activité des cellules T (490) et diminuerait la production de cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'implantation et la réceptivité de l'endomètre (447,491). L'ajout de $1,25(\text{OH})\text{D}$ à des cellules NK déciduales réduit la synthèse des cytokines CSF2, IL1, IL6 et TNF (489). Il a également été démontré qu'elle interfère avec la production de cytokines dans les cellules endométriales isolées de femmes ayant des antécédents de FCS à répétition, proposant l'hypothèse que la vitamine D pourrait jouer un rôle dans la prévention des FCS à répétition (492).

II. Objectif

L'objectif de cette dernière partie était de rechercher une association entre les issues de tentatives de FIV+/- ICSI et les concentrations folliculaires et sériques en TSH, T4L, T3L, GH, IGF1, 25(OH)D, et la présence des anticorps anti-TPO et anti-TG pour les patientes ayant bénéficié d'un transfert embryonnaire frais après une tentative de FIV+/- ICSI.

III. Matériel et méthodes

Nous avons sélectionné dans notre population initiale toutes les tentatives de FIV+/- ICSI où un transfert embryonnaire frais a eu lieu (n=68). Nous avons exclu les patientes pour lesquelles nous n'avions pas les dosages hormonaux folliculaire en totalité (n=8). Puis nous avons répartis ces 60 tentatives de FIV+/- ICSI en 2 groupes : obtention d'une grossesse (HCG>100 UI/l) (n=25) ou absence de grossesse (n=35) (figure 20). Nous avons comparé les dosages sériques et folliculaires des différentes hormones et la présence des ACAT entre ces deux groupes.

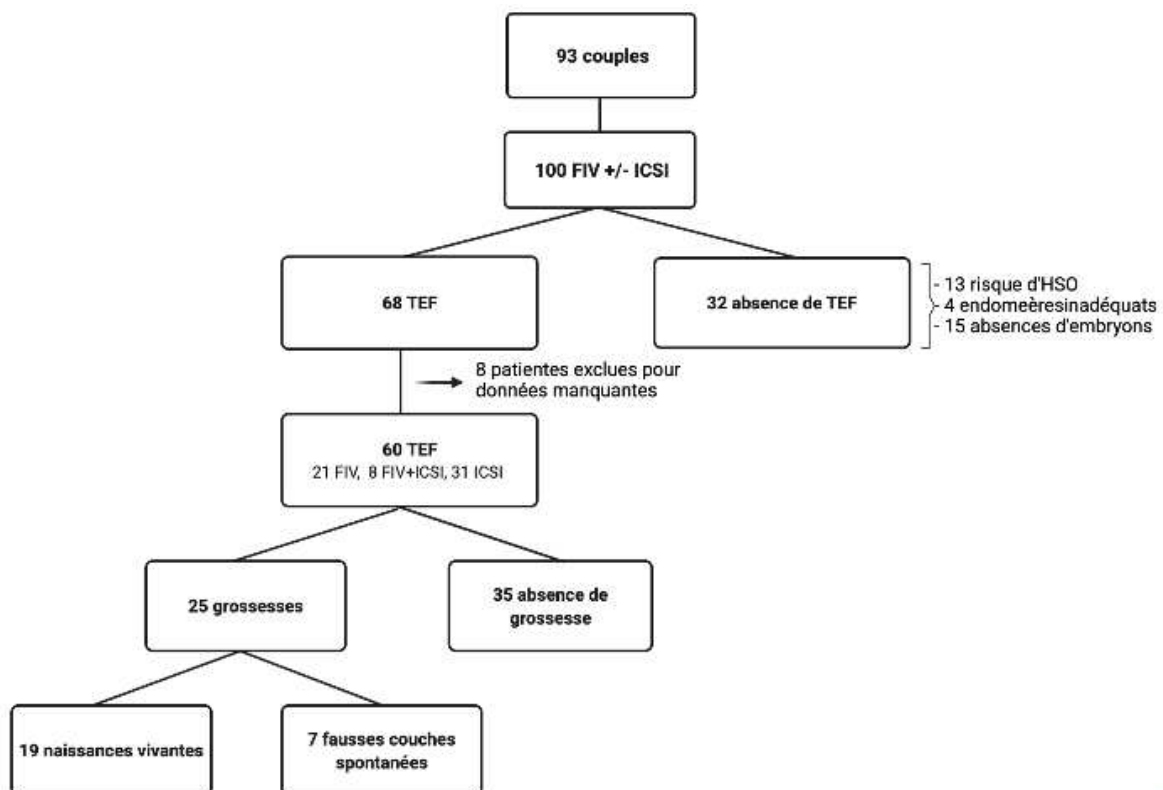


Figure 20: Flow chart de l'analyse des issues de tentatives de FIV +/- ICSI
TEF : transfert d'embryons frais

IV. Résultats

A. Caractéristiques de la population et des paramètres de tentatives de FIV+/- ICSI

Le tableau 18 présente les caractéristiques des 2 groupes. On n'observe pas de différence significative entre les deux groupes en dehors de l'IMC masculin plus faible dans le groupe grossesse (23 vs 25, $p=0,013$). Le tableau 19 présente les caractéristiques cliniques des couples exclus de cette analyse ($n=8$).

	Grossesse (n = 25)	Absence de grossesse (n = 35)	P
Durée Infertilité (années)	3.00 [2.00; 4.00]	4.00 [3.00; 5.00]	0.069
Caractéristiques féminines			
Âge	30.0 [29.0; 33.0]	29.0 [27.0; 33.5]	0.36
IMC	21.0 [20.0; 25.0]	22.0 [20.0; 25.5]	0.23
Tabac	3 (12%)	8 (23%)	0,33
FSH (UI/l)	6.70 [5.90; 7.50]	6.80 [5.55; 8.07]	0.89
AMH (ng/ml)^a	4.50 [2.80; 7.20]	2.71 [1.95; 4.03]	0.076
Endométriose	2 (8%)	6 (17%)	0.45
BRO	2 (8%)	6 (17%)	0.45
SOPK	5 (20%)	8 (23%)	0.79
Caractéristiques masculines			
Âge	32.0 [30.0; 36.0]	32.0 [29.5; 36.5]	0.8
IMC	23.0 [21.0; 24.0]	25.0 [23.0; 27.0]	0.013
Tabac	10 (40%)	17 (49%)	0.51
Paramètres spermatiques :			
- Numération (M/ml)	78.0 [20.0; 142]	50.4 [12.1; 86.0]	0.22
- Mobilité totale (%)	40.0 [30.0; 50.0]	45.0 [36.2; 55.0]	0.19
- Mobilité (% a+b)	35.0 [25.0; 45.0]	40.0 [32.2; 50.0]	0.22

Tableau 18: Caractéristiques de la population en fonction de l'obtention d'une grossesse.

Les résultats sont exprimés en médiane et Q25-75 ou pourcentage. ^a : données manquantes $n= 17$

IMC : indice de masse corporelle ; FSH : Hormone folliculostimulante ; AMH : Hormone antimüllérienne ;

BRO : baisse de réserve ovarienne, SOPK : syndrome des ovaires polykystiques

	Patientes exclues (n = 8)
Durée Infertilité (années)	4.00 [2.75; 5.00]
Caractéristiques féminines	
Âge	32.5 [30.75; 33.25]
IMC	23.5 [21.60; 28.75]
Tabac	1 (12.5%)
FSH (UI/l)	5.65 [4.87; 5,97]
AMH (ng/ml)^a	3.1 [2.55; 3.80]
Endométriose	1 (12.5%)
BRO	1 (12.5%)
SOPK	2 (25%)
Caractéristiques masculines	
Âge	32.0 [32; 35.25]
IMC	26.0 [23.0; 27.0]
Tabac	1 (12.5%)
Paramètres spermatiques :	
- Numération (M/ml)	55.25 [25.65; 90.67]
- Mobilité totale (%)	47.5 [43.76; 56.25]
- Mobilité (% a+b)	40.0 [33.75; 51.25]

Tableau 19: Caractéristiques des patientes exclues de l'analyse

Les résultats sont exprimés en médiane et Q25-75 ou pourcentage. ^a : données manquantes n= 1

IMC : indice de masse corporelle ; FSH : Hormone folliculostimulante ; AMH : Hormone antimüllérienne ;

BRO : baisse de réserve ovarienne, SOPK : syndrome des ovaires polykystiques

Le tableau 20 présente les paramètres de la stimulation et les résultats biologiques des tentatives d'ICSI en fonction de l'issue de grossesse. On n'observe pas de différence concernant les différents paramètres de la stimulation. Concernant les paramètres biologiques, on observe que le nombre moyen d'embryons transférés est supérieur dans le groupe grossesse (1,93 vs 1,63, $p < 0,001$).

	Grossesse (n = 25)	Absence de grossesse (n = 35)	P
Paramètres de la stimulation			
Protocole de stimulation			
- Antagoniste	16%	11%	0.71
- Agoniste long	84%	89%	
Nombre total unités FSH (UI)	1500 [1300; 1950]	1800 [1350; 2488]	0.15
Durée de la stimulation (jours)	11.0 [10.0; 13.0]	12.0 [10.0; 13.0]	0.79
Endomètre J-hCG (mm)	11.0 [9.00; 12.0]	10.3 [9.25; 12.0]	0.92
Taux E2 J-hCG (pg/ml)	2328 [1558; 2726]	1582 [1262; 2422]	0.066
Paramètres biologiques			
Nombre total d'ovocytes	12.0 [9.00; 16.0]	11.0 [7.00; 14.0]	0.35
Taux d'ovocytes matures	77.8 [68.8; 83.3]	77.3 [61.8; 83.3]	0.4
Taux d'ovocytes anormaux en ICSI^a	66.7 [33.3; 87.5]	62.5 [22.5; 83.3]	0.46
Taux de fécondation	80.0 [63.6; 87.5]	80.0 [64.5; 92.0]	0.85
Nombre total d'embryons à J2	6.00 [5.00; 8.25]	6.00 [4.00; 8.00]	0.4
Taux de développement embryonnaire à J2	77.5 [60.8; 91.7]	75.0 [37.3; 90.7]	0.39
Nombre d'embryons congelés*	1,28(0-4)	1.23 (0-6)	0.89
Nombre total d'embryons transférés*	1,96 (1-2)	1,63 (1-2)	<0.001

Tableau 20: Résultats de tentatives de FIV +/- ICSI en fonction de l'obtention d'une grossesse
 Les résultats sont exprimés en médiane et Q25-75, pourcentage ou moyenne et extrêmes*. ^a n= 40
 FSH: gonadotrophines; hCG: human chorionic gonadotropin; E2: oestradiol

B. Analyse des concentrations sériques et folliculaires

Le tableau 21 décrit les dosages sériques et folliculaires en TSH, T3L, T4L, GH, IGF1, 25(OH)D et la présence d'ACAT. On observe que la 25(OH)D folliculaire est plus élevée dans le groupe grossesse (29,6 ng/ml vs 20,6 ng/ml, $p=0,017$) ainsi que la 25(OH)D sérique (19,9 ng/ml vs 11,2 ng/ml, $p=0,014$). Aucune différence significative n'est mise en évidence pour les concentrations sériques et folliculaires en TSH, T3L, T4L, GH, IGF1 et pour la présence d'ACAT.

Afin de confirmer nos résultats sur la 25(OH)D folliculaire, nous avons séparé nos 60 cycles de FIV+/- ICSI en 2 groupes en fonction de la concentration en 25(OH)D folliculaire (supérieur ou inférieur à 30 ng/ml). Nous observons que les patientes ayant une 25(OH)D folliculaire inférieure à 30ng/ml ($n=42$) ont significativement un taux de grossesse plus faible que celle ayant une 25(OH)D normale ($n=18$) (61% vs. 33%, $p=0.046$).

Synthèse :

- IMC masculin plus faible dans le groupe grossesse.
- Nombre d'embryons transférés plus élevés dans le groupe grossesse.
- Concentrations 25(OH)D folliculaire et sérique plus hautes dans le groupe grossesse.
- Pas de différence pour les concentrations folliculaires et sériques en TSH, T3L, T4L, GH, IGF1 et la présence d'anticorps antithyroïdiens.

	n	Grossesse (n = 25)	Absence de grossesse (n = 35)	P
Axe thyroïdienne				
TSH folliculaire (mUI/l)	60	1.20 [0.730; 1.77]	1.31 [0.864; 1.93]	0.63
TSH sérique (mUI/l)	57	1.82 [1.29; 2.15]	1.91 [1.40; 2.45]	0.29
T3L folliculaire (pmol/l)	60	3.56 [3.10; 4.00]	3.80 [3.00; 4.19]	0.54
T3L sérique (pmol/l)	57	4.40 [4.29; 4.80]	4.50 [4.27; 4.84]	0.76
T4L folliculaire (ng/dl)	60	1.10 [1.04; 1.14]	1.09 [1.01; 1.20]	0.99
T4L sérique (ng/dl)	57	0.960 [0.885; 1.00]	0.980 [0.932; 1.08]	0.25
Anticorps anti TPO folliculaire	41	0 (0%)	3 (14%)	0.23
Anticorps anti TPO sérique	57	2 (8.7%)	8 (24%)	0,18
Anticorps anti TG folliculaire	40	1 (5%)	2 (10%)	1
Anticorps anti TG sérique	57	1 (4.3%)	3 (8.8%)	0,64
Axe somatotrope				
GH folliculaire (mUI/l)	60	4.50 [2.17; 6.36]	2.84 [1.18; 4.85]	0.099
GH sérique (mUI/l)	22	3.69 [1.62; 17.6]	4.42 [1.14; 9.45]	0.86
IGF1 folliculaire (ng/ml)	60	70.2 [34.3; 97.1]	64.5 [28.6; 88.4]	0.42
IGF1 sérique (ng/ml)	22	182 [156; 226]	139 [117; 172]	0.06
Vitamine D				
Vitamine D folliculaire (ng/ml)	60	29.6 [21.7; 38.8]	20.6 [15.6; 27.0]	0.017
Vitamine D sérique (ng/ml)	14	19.9 [17.7; 22.3]	11.2 [7.38; 15.6]	0.014

Tableau 21: Dosages hormonaux et présence d'ACAT folliculaires et sériques en fonction de l'obtention d'une grossesse
Les résultats sont exprimés en médiane et Q25-75 ou pourcentage

Lors de la rédaction de l'article issus de cette analyse, nous avons décidé de ne présenter et de ne discuter uniquement les concentrations folliculaires au vu du nombre de données manquantes concernant les concentrations sériques. Cet article a été soumis le 20 octobre 2021 dans « *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction* ».

Title: Follicular vitamin D levels are associated with the chance of pregnancy in IVF

Abstract:

Introduction

Obtaining a competent embryo for its implantation is subject to many intrinsic and extrinsic variables to the couple, the female hormonal environment being one of the factors. The objective of the study was to analyze the association between the follicular levels of growth hormone (GH), insulin-like growth factor 1 (IGF1), 25-hydroxy vitamin D (25OHD), thyroid-stimulating hormone (TSH), free triiodothyronine (fT3), free thyroxine (fT4) and antithyroid antibodies (ATA) and the chance of pregnancy in *in vitro* fecundation (IVF).

Materials and methods

We conducted a prospective study at a reproductive medicine centre at Amiens-Picardie University Hospital (Amiens, France) from January 2013 to December 2017. 93 couples for first or second IVF were recruited. 60 IVF+/- intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with fresh embryo transfer were included. Two groups were constituted according to the issue: pregnancy (n=25) and no pregnancy (n=35). GH, IGF1, 25OHD, TSH, fT3, fT4 and ATA were measured in follicular fluid.

Results:

There was no difference in clinical parameters between the two groups except for male BMI who was higher in the no pregnancy group (23 vs. 25, respectively; p=0.013). Concerning IVF result, the number of fresh embryos transferred is slightly higher in the pregnancy group (1.96 vs. 1.63, respectively; p<0,001). Follicular 25OHD level was significantly higher in the pregnancy group (29.6 vs. 20.6 ng/ml, respectively; p=0.017). There was no association with follicular GH, IGF1, TSH, fT3 and fT4 levels and prevalence of antithyroid antibodies and pregnancy.

Conclusions

Pregnancy in IVF appears to be associated with follicular levels of 25OHD.

Keywords: pregnancy, follicular fluid, in vitro fecundation, 25-hydroxy vitamin D

Declarations of interest: none

Funding :

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors

Introduction

Many factors influenced the chance of pregnancy in assisted reproductive technology (ART). Obtaining a competent embryo for its implantation is subject to many intrinsic and extrinsic variables to the couple, the female hormonal environment being one of the factors. Follicular fluid (FF) provides the microenvironment for oocyte maturation [1] and contains hormones with pleomorphic effects which are involved in ovarian folliculogenesis, oogenesis and steroidogenesis. Studies have shown that growth hormone (GH), insulin-like growth factor 1 (IGF1), thyroid-stimulating hormone (TSH) and thyroid hormones (THs, e.g., free triiodothyronine (fT3) and free thyroxine (fT4)) play a role in ovarian function. GH has both direct and IGF1-mediated effects, and stimulates folliculogenesis, oocyte maturation and steroidogenesis [2,3]. THs improve granulosa cell proliferation [4], inhibit their apoptosis [5] and participate in steroidogenesis [6]. Most studies have shown an increase in the prevalence of ATA in infertile women, which is estimated between 9% and 18% [7,8] and a negative effect on pregnancy issues in ART [9]. More recently 1,25 hydroxyvitamin D (1,25OHD) has also been described as an actor in ovarian folliculogenesis [10,11] and steroidogenesis [12] and the role of 25-hydroxy vitamin D (25OHD) in the chances of pregnancy in IVF is discussed [13].

The objective of this study was to search an association between the chance of pregnancy after a fresh embryo transfer (FET) for IVF and follicular levels of GH, IGF1, 25OHD, TSH, fT4, fT3 and anti-tyroperoxydase (TPO) and anti-thyroglobuline (TG) antibodies.

Materials and methods

We conducted a prospective study at a reproductive medicine centre at Amiens-Picardie University Hospital (Amiens, France) from January 2013 to December 2017. The study protocol was approved by the local investigational review board (Amiens, France; reference: RCB 2011-A00634-37). All the study participants (couples participating in an ICSI program, regardless of the indication) provided their informed consent. All the women were euthyroid at the time when their ICSI program started. The main inclusion criteria were first or second ICSI cycle, age under 36 (for women) or 45 (for men), and a sperm concentration greater than 5×10^6 /mL.

COS and IVF protocols

Two COS protocols were used: a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) long agonist protocol and a GnRH antagonist protocol. The long agonist protocol involved pituitary downregulation with a GnRH agonist (triptorelin acetate: Décapeptyl[®], Ipsen Pharma, France; 0.1 mg per day for 14 days, starting in the midluteal phase), followed by the administration of recombinant human follicle-stimulating hormone (rFSH: Puregon[®], Organon, France, or Gonal-F[®], Merck Serono SAS, France) or human menopausal gonadotropin (HMG, Menopur[®], Ferring, France), in combination with a GnRH agonist (triptorelin acetate: Décapeptyl[®], Ipsen Pharma, France; 0.05 mg per day). In the antagonist protocol, rFSH was administered subcutaneously each day from day 2 of the cycle until a 14 mm dominant follicle was detected. Cetrotrel acetate (Cetrotide[®], Merck Serono, France; 0.25 mg per day) was then administered daily until the recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) day (Ovitrelle[®], Merck Serono SAS).

1 The stimulation protocols and the type and dose of FSH were chosen by the gynecologist, as
2 a function of the patient's age, body mass index (BMI), and ovarian reserve.

3 When at least three follicles had reached a diameter of more than 16 mm, a 250 µg
4 dose of rhCG was administered. The oocytes were retrieved 36 h after hCG administration,
5 via ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration. Progesterin (Utrogestan® 400 mg,
6 Besins International, France) was used for luteal support.

7 8 9 *Group formation*

10 We included from our initial population all the patients who had a FET and divided
11 the patients into two groups according to the issue: pregnancy or no pregnancy. Pregnancy
12 was defined as a serum hCG > 100 IU/L 14 days after FET.

13 14 15 *Preparation of follicular fluid samples*

16 Following oocyte decoronation, each patient's remaining FF samples were pooled.
17 After the removal of cells by centrifugation at 2000 g for 10 minutes, the supernatant was
18 recovered, stored at -20°C, and thawed immediately prior to analysis. FF samples that were
19 contaminated with blood were excluded.

20 21 22 *Hormone and antithyroid antibody assays*

23 All hormone assays and antithyroid antibody screens were carried out as a single
24 series at the end of the study. ELISAs were used to determine levels of TSH, fT3, fT4 (ELISA
25 VISTA 500™, Siemens Healthcare Diagnostics, Germany), 25OHD, anti-TPO antibodies
26 (CENTAUR XP™, Siemens Healthcare Diagnostic, Germany), GH and IGF1 (IMMULITE
27 2000XPi, Siemens Healthcare Diagnostic, Germany). Anti-TG antibody titers were measured
28 using an immunoradiometric assay (Immunotech®, Beckman Coulter, Czech Republic). The
29 intra- and inter-assay coefficients of variation were below 10% in all cases.

30 31 32 *Statistical analysis*

33 All statistical analyses were performed with *pvalue.io* software[14]. Data were
34 expressed as the median [interquartile range], mean (extreme) or the frequency
35 (percentage). Intergroup differences groups were probed with a Mann-Whitney test (for
36 quantitative variables) or a chi-squared test or Fisher's exact test (for qualitative variables).
37 The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

38 39 40 **Results**

41 42 43 *Characteristics of the study population and ICSI*

44 A total of 93 couples were included in the study and 100 IVF +/- ICSI were performed. 68
45 IVF cycles had a FET, 8 were excluded for missing follicular hormonal level data. The 32 FET
46 failures were due to a lack of transferable embryos, an inadequate endometrium, or a risk of
47 ovarian hyperstimulation syndrome. Of the 60 attempts included for 60 couples, 25 resulted
48 in a pregnancy and 35 did not (Figure 1). The pregnancy rate by FET was 41,6%.

49 There were no significant differences between the two groups with regard to age,
50 smoking status, ovarian reserve, duration of infertility, gynecological disease and sperm
51 parameters. The only significant difference was a lower male body mass index (BMI) in the
52 pregnancy group (23 vs. 25, respectively; $p = 0.013$).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

There were no differences between the pregnancy and no pregnancy group with regard to ovarian stimulation characteristics and biological parameters (Table 2). The number of embryos transferred was slightly higher in the pregnancy group (1.96 vs. 1.63, respectively; $p < 0,001$).

Hormonal and antithyroid antibodies assay in serum and FF

In our population we observed that 70% of the patients have a follicular 25OHD levels under 30 ng/ml. 6,6% of patients had ATA in FF. The follicular 25OHD level was significantly higher in the pregnancy group than in the non-pregnancy group (29.6 vs. 20.6 ng/ml, respectively; $p = 0.017$) (Table 3). The intergroup differences in follicular levels of GH, IGF1, TSH, fT3, fT4, and antithyroid antibodies were not statistically significant.

In order to confirm our results for 25OHD, we separated the 60 IVF cycles into two groups based on the follicular level of 25OHD (greater or less than 30 ng/ml). We observed that patients with a 25OHD deficiency ($n = 42$) had a lower pregnancy rate than no deficiency patient ($n = 18$) (61% vs. 33%, respectively; $p = 0.046$).

Discussion

In our cohort, the pregnancy rate was 41,6%, which was concordant with the pregnancy rate of other studies. The population of our two groups were only different for male BMI which was lower in the pregnancy group. Results in literature are discordant, some found a negative effect of male BMI on ICSI outcomes [15,16] and others did not find any effect [17]. In IVF results, the number of fresh embryos transferred was slightly higher in the pregnancy group, which was concordant with literature data [18].

GH exerts direct and IGF1-mediated effects on folliculogenesis, oocyte development and steroidogenesis [2,3], and reduce oxidative stress markers in FF [19]. GH and IGF1 are also synergic with gonadotrophins as it improves the ovarian reactivity to FSH and LH by increasing the expression of FSH/LH receptors [20].

In our study we did not observe an association for follicular GH and IGF1 levels and chance of pregnancy. In literature, follicular [21] and serum GH [22] had a positive correlation with pregnancy rate. It was observed that follicular IGF1 was higher in FF of pregnant patients [21] but no correlation with the pregnancy rate was observed [23].

To evaluate the impact of GH/IGF1 system on IVF results, many studies assessed the impact of GH adjuvant treatment during IVF. In poor responders, four meta-analyses and a Cochrane review demonstrated a significantly improvement of pregnancy and live birth rates [24–28]. For normo-ovulatory, the Cochrane review did not observe difference in pregnancy and live birth rates [26], whereas one recent RCT demonstrated a beneficial effect on the live birth rate [29].

The role of oocyte modification on a successful IVF outcome and pregnancy could be challenged by the GH endometrial effect. GH [30] and its receptor [31], IGF1 and its receptors [32] are detected in endometrial cells. They are involved in endometrial proliferation and in secretory transformation in the luteal phase by promoting the embryo implantation window [33,34]. Local regulation by sex steroids seems to be involved in the control of the uterine GH / IGF1 system [34]. The frozen embryo transfer model is interesting for evaluating this endometrial effect. It has been observed that protocols using GH as adjuvant treatment improve endometrial thickness and pregnancy rate [35].

1 In our study, 6,6% of our population had a follicular ATA, which is lower than the
2 higher prevalence of ATA in infertile women estimated between 9% and 18% [7,8]. We did
3 not observe association between follicular ATA and the chance of pregnancy.

4 Three studies have evaluated the influence of ATA in FF on IVF results. Two studies
5 observed a decrease in pregnancy rates [36,37] although a team did not observe any
6 difference [38] confirming our result.

7 As follicular ATA are correlated with serum ATA, we looked for the impact of serum
8 ATA on IVF outcomes in literature. 3 meta-analyses did not observe any difference in
9 pregnancy [9,39,40] or live birth rate [39,40] but they all observed significant increase of
10 miscarriage rate [9,39,40]. One observed a decrease of birth rate [9].

11 While the role of THs in folliculogenesis [4] and ovarian steroidogenesis [6] has been
12 demonstrated, our study did not show an association between the chances of pregnancy
13 and the follicular levels in the normal values of TSH, fT4 and fT3. However, the patients all
14 presented a balanced thyroid function with in particular a target TSH <2.5 before starting the
15 pregnancy [41].

16 Two meta-analyses were carried out in 2018 [42] and 2019 [43] to assess the impact
17 of serum TSH (more or less 2,5 mUI/L) in euthyroid women at the start of stimulation on IVF
18 outcomes. Neither found a difference in pregnancy, miscarriage or live birth rate.

19 Concerning analysis of FF, pregnant patients have a higher follicular fT4, but that
20 there is no difference for follicular TSH and fT3 [38].

21 Finally, only higher follicular 25OHD levels were associated with the chance of
22 pregnancy in IVF in our study. We observed a high prevalence of low 25OHD follicular level
23 in our population (70%) which is concordant with literature. Indeed the prevalence of
24 25OHD deficiency is high in our region of the north of France [44]. Furthermore, this
25 prevalence in the infertile population is high: nearly 80% of infertile patients followed in ART
26 are said to be vitamin D deficient [45].

27 Few teams have been interested in the follicular 25OHD levels and the IVF outcomes.
28 As observed in our study, Ozkan and al observed a positive correlation between follicular
29 25OHD and the chance of pregnancy [46]. Two teams showed no difference in pregnancy
30 rate [47,48]. Conversely, two others observed a negative correlation between follicular
31 25OHD and pregnancy [49,50] and live birth rates [50].

32 Several meta-analysis have been performed to assess the impact of 25OHD serum
33 deficiency on IVF outcomes. Two meta-analysis in 2016 (5 studies) and 2018 (9 cohorts)
34 showed a significant decrease in live births but not in pregnancy rates [51,52]. Another 2018
35 meta-analysis (11 studies) found a significant decrease of pregnancy and live birth rates.
36 Cozzolino's latest meta-analysis from 2020 (14 studies) found no difference between serum
37 25OHD levels on pregnancy, miscarriage and live birth rate [13].

38 In order to study how the vitamin D deficiency affects the results of IVF, two
39 randomized controlled trials were carried out to evaluate the effect of vitamin D
40 replacement. It included vitamin D deficiency patient: one group receiving 600,000 IU of
41 vitamin D before starting IVF treatment and the other a placebo. There was no difference
42 between the groups in clinical pregnancy, miscarriage and live births rate [53]. A second RCT
43 assessed the impact of vitamin D replacement on IVF results from the hCG day until
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 pregnancy. There was a significant increase in the implantation rate but not in the evolutive
2 pregnancy rate [54].

3 Little is known about the mechanisms explaining a potential impact on the chances of
4 IVF pregnancy. Few studies had evaluated the potential role of vitamin D in ovarian function.
5 The vitamin D receptor (VDR) is detected in stromal, granulosa and thecal ovarian cells [55].
6 Two studies observed that supplementation with 1,25OHD increases granulosa cell
7 proliferation and differentiation and oocyte maturation [10,11]. The role in ovarian
8 steroidogenesis is still unclear [12]. It has been showed that vitamin D supplementation
9 reduce inflammation and oxidative stress in PCOS [56].

10 For some authors, the impact of 25OHD on IVF results is not linked to the
11 improvement in embryonic quality, but rather to the receptivity of the endometrium. VDR is
12 also detected in stromal cells of the endometrium and in the myometrium throughout all
13 phases of the cycle [57]. 1,25OHD binds to VDR in the endometrium to regulate embryo
14 implantation target genes such as calbindin, osteopontin, and HOX10A [58]. 1,25OHD has
15 also an immunosuppressive role by modulating the activity of T cells [59] and decreases the
16 production of pro-inflammatory cytokines involved in the implantation and receptivity of the
17 endometrium [51].

18 Thus, the oocyte donation model has been proposed. Three teams evaluated the
19 outcomes of oocyte donation as a function of the oocyte recipient's serum 25OHD levels.
20 There is no difference in endometrial thickness [60] and pregnancy rate [60,61]. One team
21 observes significant decrease in pregnancy rates in vitamin D-deficient patients [62]. As with
22 oocyte donation, one study used the frozen embryo transfer model to assess the
23 endometrial effect of vitamin D, no correlation between pregnancy rate and vitamin D
24 deficiency has been found [63]. The oocyte donation and frozen embryo transfer models
25 didn't show any influence of 25OHD on pregnancy chance via endometrial receptivity.

26 As said in all studies about health effects of vitamin D, another hypothesis would be
27 that vitamin D only reflects a better healthy lifestyle such as a healthier eating habits and a
28 more regular physical activity outdoors [64,65]. The impact of vitamin D on fertility is
29 therefore to elucidate.

30 **Conclusion**

31 In our population with a vitamin D deficiency, we observed that pregnancy chance in
32 IVF was associated a higher follicular 25OHD levels. We didn't show an association between
33 the chances of pregnancy and the follicular levels in the normal status of GH, IGF1, TSH, FT4
34 and FT3. Follicular ATA are not associated with a lower chance of pregnancy. More studies
35 are necessary to specify these hormones and antibodies actions.
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- [1] Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. *Biol Reprod* 2010;82:1021–9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.082941>.
 - [2] Chandrashekar V, Zaczek D, Bartke A. The consequences of altered somatotropic system on reproduction. *Biol Reprod* 2004;71:17–27. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.027060>.
 - [3] Karamouti M, Kollia P, Kallitsaris A, Vamvakopoulos N, Kollios G, Messinis IE. Growth hormone, insulin-like growth factor I, and leptin interaction in human cultured lutein granulosa cells steroidogenesis. *Fertil Steril* 2008;90:1444–50. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.08.076>.
 - [4] Maruo T, Hayashi M, Matsuo H, Yamamoto T, Okada H, Mochizuki M. The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in the functional differentiation of cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1987;121:1233–41.
 - [5] Verga Falzacappa C, Mangialardo C, Patriarca V, Bucci B, Amendola D, Raffa S, et al. Thyroid hormones induce cell proliferation and survival in ovarian granulosa cells COV434. *J Cell Physiol* 2009;221:242–53. <https://doi.org/10.1002/jcp.21849>.
 - [6] Wakim AN, Polizotto SL, Burholt DR. Augmentation by thyroxine of human granulosa cell gonadotrophin-induced steroidogenesis. *Hum Reprod Oxf Engl* 1995;10:2845–8.
 - [7] So S, Yamaguchi W, Murabayashi N, Miyano N, Tawara F. Effect of moderately increased thyroid-stimulating hormone levels and presence of thyroid antibodies on pregnancy among infertile women. *Reprod Med Biol* 2020;19:82–8. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12306>.
 - [8] van den Boogaard E, Vissenberg R, Land JA, van Wely M, van der Post JAM, Goddijn M, et al. Significance of (sub)clinical thyroid dysfunction and thyroid autoimmunity before conception and in early pregnancy: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011;17:605–19. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr024>.
 - [9] Busnelli A, Paffoni A, Fedele L, Somigliana E. The impact of thyroid autoimmunity on IVF/ICSI outcome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2016;22:775–90. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw019>.
 - [10] Xu J, Lawson MS, Xu F, Du Y, Tkachenko OY, Bishop CV, et al. Vitamin D3 Regulates Follicular Development and Intrafollicular Vitamin D Biosynthesis and Signaling in the Primate Ovary. *Front Physiol* 2018;9:1600. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01600>.
 - [11] Xu J, Hennebold JD, Seifer DB. Direct vitamin D3 actions on rhesus macaque follicles in three-dimensional culture: assessment of follicle survival, growth, steroid, and antimüllerian hormone production. *Fertil Steril* 2016;106:1815–1820.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.08.037>.
 - [12] Merhi Z, Doswell A, Krebs K, Cipolla M. Vitamin D alters genes involved in follicular development and steroidogenesis in human cumulus granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E1137–1145. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-4161>.
 - [13] Cozzolino M, Busnelli A, Pellegrini L, Riviello E, Vitagliano A. How vitamin D level influences in vitro fertilization outcomes: results of a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2020;114:1014–25. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.05.040>.
 - [14] Medistica. pvalue.io, a graphic user interface to the R statistical analysis software for scientific medical publications 2019.

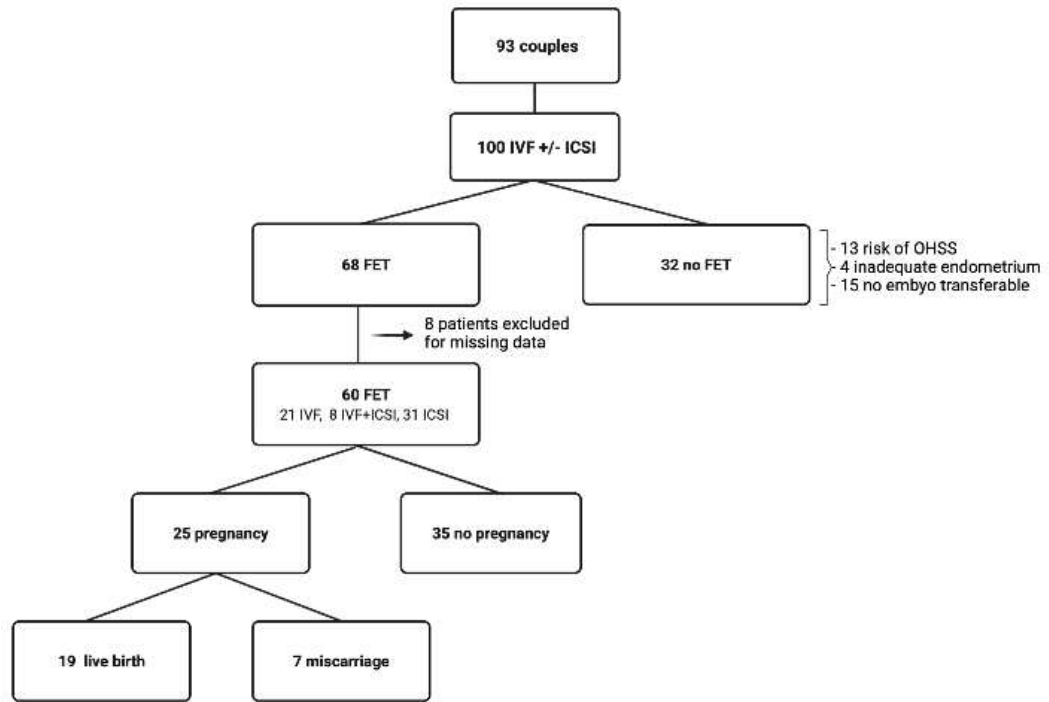
- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- [15] Anifandis G, Dafopoulos K, Messini CI, Polyzos N, Messinis IE. The BMI of men and not sperm parameters impact on embryo quality and the IVF outcome. *Andrology* 2013;1:85–9. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2012.00012.x>.
- [16] Colaci DS, Afeiche M, Gaskins AJ, Wright DL, Toth TL, Tanrikut C, et al. Men’s body mass index in relation to embryo quality and clinical outcomes in couples undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2012;98:1193-1199.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1102>.
- [17] Arabipoor A, Ashrafi M, Hemat M, Zolfaghari Z. The Effects of Maternal and Paternal Body Mass Index on Live Birth Rate after Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles. *Int J Fertil Steril* 2019;13:24–31. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2019.5433>.
- [18] Cetin MT, Kumtepe Y, Kiran H, Seydaoglu G. Factors affecting pregnancy in IVF: age and duration of embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 2010;20:380–6. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.12.008>.
- [19] Gong Y, Luo S, Fan P, Jin S, Zhu H, Deng T, et al. Growth hormone alleviates oxidative stress and improves oocyte quality in Chinese women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial. *Sci Rep* 2020;10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75107-4>.
- [20] Stocco C, Baumgarten SC, Armouti M, Fierro MA, Winston NJ, Scoccia B, et al. Genome-wide interactions between FSH and insulin-like growth factors in the regulation of human granulosa cell differentiation. *Hum Reprod Oxf Engl* 2017;32:905–14. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex002>.
- [21] Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, et al. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod Oxf Engl* 2002;17:1017–22.
- [22] Potashnik G, Lunenfeld E, Shwartz I, Glezerman M, Roberts CT, LeRoith D, et al. Endogenous plasma growth hormone and the occurrence of pregnancies in patients undergoing in-vitro fertilization and embryo transfer with ovarian stimulation. *Hum Reprod Oxf Engl* 1995;10:1065–9. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136095>.
- [23] Fried G, Remaesus K, Harlin J, Krog E, Csemiczky G, Aanesen A, et al. Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-I/IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2003;20:167–76. <https://doi.org/10.1023/a:1023656225053>.
- [24] Hart RJ. Use of Growth Hormone in the IVF Treatment of Women With Poor Ovarian Reserve. *Front Endocrinol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00500>.
- [25] Li X-L, Wang L, Lv F, Huang X-M, Wang L-P, Pan Y, et al. The influence of different growth hormone addition protocols to poor ovarian responders on clinical outcomes in controlled ovary stimulation cycles: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2017;96:e6443. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000006443>.
- [26] Harper K, Proctor M, Hughes E. Growth hormone for in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev* 2003:CD000099. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000099>.
- [27] Yu X, Ruan J, He L-P, Hu W, Xu Q, Tang J, et al. Efficacy of growth hormone supplementation with gonadotrophins in vitro fertilization for poor ovarian responders: an updated meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:4954–67.
- [28] Hart RJ, Rombauts L, Norman RJ. Growth hormone in IVF cycles: any hope? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2017;29:119–25. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000360>.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- [29] Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, Arfuso F, Dharmarajan A. Growth hormone during in vitro fertilization in older women modulates the density of receptors in granulosa cells, with improved pregnancy outcomes. *Fertil Steril* 2018;110:1298–310. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.08.018>.
- [30] Ueberberg B, Unger N, Saeger W, Mann K, Petersenn S. Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme* 2009;41:814–21. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1233462>.
- [31] Sbracia M, Scarpellini F, Poverini R, Alò PL, Rossi G, Di Tondo U. Immunohistochemical localization of the growth hormone in human endometrium and decidua. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989 2004;51:112–6. <https://doi.org/10.1046/j.8755-8920.2003.00127.x>.
- [32] Shifren JL, Osathanondh R, Yeh J. Human fetal ovaries and uteri: developmental expression of genes encoding the insulin, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor II receptors. *Fertil Steril* 1993;59:1036–40. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)55924-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)55924-x).
- [33] Gunin AG. Influence of growth hormone on the uterine response to oestradiol in rats. *J Reprod Fertil* 1997;110:299–306. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1100299>.
- [34] Kapur S, Tamada H, Dey SK, Andrews GK. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone. *Biol Reprod* 1992;46:208–19. <https://doi.org/10.1095/biolreprod46.2.208>.
- [35] Cui N, Li A-M, Luo Z-Y, Zhao Z-M, Xu Y-M, Zhang J, et al. Effects of growth hormone on pregnancy rates of patients with thin endometrium. *J Endocrinol Invest* 2019;42:27–35. <https://doi.org/10.1007/s40618-018-0877-1>.
- [36] Medenica S, Garalejic E, Arsic B, Medjo B, Bojovic Jovic D, Abazovic D, et al. Follicular fluid thyroid autoantibodies, thyrotropin, free thyroxine levels and assisted reproductive technology outcome. *PloS One* 2018;13:e0206652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206652>.
- [37] Monteleone P, Parrini D, Faviana P, Carletti E, Casarosa E, Uccelli A, et al. Female infertility related to thyroid autoimmunity: the ovarian follicle hypothesis. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989 2011;66:108–14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00961.x>.
- [38] Cai YY, Lin N, Zhong LP, Duan HJ, Dong YH, Wu Z, et al. Serum and follicular fluid thyroid hormone levels and assisted reproductive technology outcomes. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2019;17:90. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0529-0>.
- [39] Wu H, Hong T, Gao H, Wang H. [Effects of thyroid autoimmunity on pregnancy outcomes in euthyroid women receiving in vitro fertilization: a meta-analysis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2015;95:3770–4.
- [40] Toulis KA, Goulis DG, Venetis CA, Kolibianakis EM, Negro R, Tarlatzis BC, et al. Risk of spontaneous miscarriage in euthyroid women with thyroid autoimmunity undergoing IVF: a meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 2010;162:643–52. <https://doi.org/10.1530/EJE-09-0850>.
- [41] HAS. Hypothyroïdies frustes chez l’adulte : diagnostic et prise en charge. Haute Aut Santé 2007. https://www.has-sante.fr/jcms/c_598104/fr/hypothyroïdies-frustes-chez-l-adulte-diagnostic-et-prise-en-charge (accessed June 15, 2021).

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- [42] Zhao T, Chen BM, Zhao XM, Shan ZY. Meta-analysis of ART outcomes in women with different preconception TSH levels. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2018;16:111. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0424-0>.
- [43] Jin L, Wang M, Yue J, Zhu G-J, Zhang B. Association between TSH Level and Pregnancy Outcomes in Euthyroid Women Undergoing IVF/ICSI: A Retrospective Study and Meta-analysis. *Curr Med Sci* 2019;39:631–7. <https://doi.org/10.1007/s11596-019-2084-5>.
- [44] Vernay M, Sponga M, Salanave B, Oleko A, Deschamps V, Malon A, et al. Statut en vitamine D de la population adulte en France : l'Étude nationale nutrition santé (ENNS, 2006-2007). *Bull Épidémiologique Hebd Santé Publique Fr* 2012;189–94.
- [45] Chu J, Gallos I, Tobias A, Tan B, Eapen A, Coomarasamy A. Vitamin D and assisted reproductive treatment outcome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;33:65–80. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex326>.
- [46] Ozkan S, Jindal S, Greenesid K, Shu J, Zeitlian G, Hickmon C, et al. Replete vitamin D stores predict reproductive success following in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2010;94:1314–9. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.019>.
- [47] Firouzabadi RD, Rahmani E, Rahsepar M, Firouzabadi MM. Value of follicular fluid vitamin D in predicting the pregnancy rate in an IVF program. *Arch Gynecol Obstet* 2014;289:201–6. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-2959-9>.
- [48] Aleyasin A, Hosseini MA, Mahdavi A, Safdarian L, Fallahi P, Mohajeri MR, et al. Predictive value of the level of vitamin D in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive technology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;159:132–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.07.006>.
- [49] Anifandis GM, Dafopoulos K, Messini CI, Chalvatzas N, Liakos N, Pournaras S, et al. Prognostic value of follicular fluid 25-OH vitamin D and glucose levels in the IVF outcome. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2010;8:91. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-91>.
- [50] Ciepiela P, Dulęba AJ, Kowaleczko E, Chełstowski K, Kurzawa R. Vitamin D as a follicular marker of human oocyte quality and a serum marker of in vitro fertilization outcome. *J Assist Reprod Genet* 2018;35:1265–76. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1179-4>.
- [51] Zhao J, Huang X, Xu B, Yan Y, Zhang Q, Li Y. Whether vitamin D was associated with clinical outcome after IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2018;16:13. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0324-3>.
- [52] Lv SS, Wang JY, Wang XQ, Wang Y, Xu Y. Serum vitamin D status and in vitro fertilization outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2016;293:1339–45. <https://doi.org/10.1007/s00404-016-4058-1>.
- [53] Somigliana E, Sarais V, Reschini M, Ferrari S, Makieva S, Chiara Cermisoni G, et al. Single oral dose of vitamin D3 supplementation prior to in vitro fertilization and embryo transfer in normal weight women: the SUNDRO randomized controlled trial. *Am J Obstet Gynecol* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.04.234>.
- [54] Bezerra Espinola MS, Bilotta G, Aragona C. Positive effect of a new supplementation of vitamin D3 with myo-inositol, folic acid and melatonin on IVF outcomes: a prospective randomized and controlled pilot study. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol* 2021;37:251–4. <https://doi.org/10.1080/09513590.2020.1760820>.
- [55] Parikh G, Varadinova M, Suwandhi P, Araki T, Rosenwaks Z, Poretsky L, et al. Vitamin D regulates steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) production in human ovarian cells. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab* 2010;42:754–7. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1262837>.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- [56] Akbari M, Ostadmohammadi V, Lankarani KB, Tabrizi R, Kolahehdooz F, Heydari ST, et al. The Effects of Vitamin D Supplementation on Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress Among Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab* 2018;50:271–9. <https://doi.org/10.1055/s-0044-101355>.
- [57] Vienonen A, Miettinen S, Bläuer M, Martikainen PM, Tomás E, Heinonen PK, et al. Expression of nuclear receptors and cofactors in human endometrium and myometrium. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11:104–12. <https://doi.org/10.1016/j.jsg.2003.09.003>.
- [58] Evans KN, Nguyen L, Chan J, Innes BA, Bulmer JN, Kilby MD, et al. Effects of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cytokine production by human decidual cells. *Biol Reprod* 2006;75:816–22. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054056>.
- [59] Evans KN, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M. Vitamin D and placental-decidual function. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11:263–71. <https://doi.org/10.1016/j.jsg.2004.02.002>.
- [60] Banker M, Sorathiya D, Shah S. Vitamin D Deficiency Does Not Influence Reproductive Outcomes of IVF-ICSI: A Study of Oocyte Donors and Recipients. *J Hum Reprod Sci* 2017;10:79–85. https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_117_16.
- [61] Fabris A, Pacheco A, Cruz M, Puente JM, Fatemi H, Garcia-Velasco JA. Impact of circulating levels of total and bioavailable serum vitamin D on pregnancy rate in egg donation recipients. *Fertil Steril* 2014;102:1608–12. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.08.030>.
- [62] Rudick BJ, Ingles SA, Chung K, Stanczyk FZ, Paulson RJ, Bendikson KA. Influence of vitamin D levels on in vitro fertilization outcomes in donor-recipient cycles. *Fertil Steril* 2014;101:447–52. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.10.008>.
- [63] van de Vijver A, Drakopoulos P, Van Landuyt L, Vaiarelli A, Blockeel C, Santos-Ribeiro S, et al. Vitamin D deficiency and pregnancy rates following frozen-thawed embryo transfer: a prospective cohort study. *Hum Reprod Oxf Engl* 2016;31:1749–54. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew107>.
- [64] Vranić L, Mikolašević I, Milić S. Vitamin D Deficiency: Consequence or Cause of Obesity? *Med Kaunas Lith* 2019;55. <https://doi.org/10.3390/medicina55090541>.
- [65] Manferdelli G, La Torre A, Codella R. Outdoor physical activity bears multiple benefits to health and society. *J Sports Med Phys Fitness* 2019;59:868–79. <https://doi.org/10.23736/S0022-4707.18.08771-6>.

Figure 1: Study flow chart



IVF: In vitro fecundation; ICSI: intra-cytoplasmic sperm injection; FET: fresh embryo transfer; OHSS: ovarian hyperstimulation syndrome

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 1: Characteristics of the female and male characteristics according to pregnancy.

	Pregnancy (n = 25)	No pregnancy (n = 35)	p
Duration of infertility (years)	3.00 [2.00; 4.00]	4.00 [3.00; 5.00]	0.069
Characteristics of the women:			
- Age (Years)	30.0 [29.0; 33.0]	29.0 [27.0; 33.5]	0.36
- BMI (kg/m ²)	21.0 [20.0; 25.0]	22.0 [20.0; 25.5]	0.23
- Current smoker	3 (12%)	8 (23%)	0,33
- FSH on day 3 (UI/L)	6.70 [5.90; 7.50]	6.80 [5.55; 8.07]	0.89
- Endometriosis	2 (8%)	6 (17%)	0.45
- POF	2 (8%)	6 (17%)	0.45
- PCOS	5 (20%)	8 (23%)	0.79
Characteristics of the men:			
- Age (Years)	32.0 [30.0; 36.0]	32.0 [29.5; 36.5]	0.8
- BMI (kg/m ²)	23.0 [21.0; 24.0]	25.0 [23.0; 27.0]	0.013
- Current smoker	10 (40%)	17 (49%)	0.51
Sperm parameters:			
- Sperm concentration (M/ml)	78.0 [20.0; 142]	50.4 [12.1; 86.0]	0,22
- Progressive motility (%)	35.0 [25.0; 45.0]	40.0 [32.2; 50.0]	0.22

The data are expressed as the median [interquartile range] or the frequency (percentage).
 BMI = body mass index; FSH = follicle-stimulating hormone; POF = premature ovarian failure;
 PCOS = polycystic ovary syndrome

Table 2: The Ovarian response and ICSI outcome according to pregnancy

	Pregnancy (n = 25)	No pregnancy (n = 35)	p
COS protocol:			
- GnRH antagonist	16%	11%	0.71
- Long GnRH agonist	84%	89%	
Total dose of rFSH/hMG (IU)	1500 [1300; 1950]	1800 [1350; 2488]	0.15
Duration of COS (day)	11.0 [10.0; 13.0]	12.0 [10.0; 13.0]	0.79
Endometrial thickness at day of HCG (mm)	11.0 [9.00; 12.0]	10.3 [9.25; 12.0]	0.92
E2 level on the hCG day (pg/ml)	2328 [1558; 2726]	1582 [1262; 2422]	0.066
Number of oocytes retrieved	12.0 [9.00; 16.0]	11.0 [7.00; 14.0]	0.35
Matures oocytes rate (%)	77.8 [68.8; 83.3]	77.3 [61.8; 83.3]	0.4
Abnormal oocyte rate in ICSI (%)^a	66.7 [33.3; 87.5]	62.5 [22.5; 83.3]	0.46
Fertilization rate (%)	80.0 [63.6; 87.5]	80.0 [64.5; 92.0]	0.85
Number of day 2 embryo	6.00 [5.00; 8.25]	6.00 [4.00; 8.00]	0.4
Day 2 embryo development rate	77.5 [60.8; 91.7]	75.0 [37.3; 90.7]	0.39
Number of frozen embryos*	1,28(0-4)	1.23 (0-6)	0.89
Number of embryos transferred*	1,96 (1-2)	1,63 (1-2)	<0.001

The data are expressed as the median [interquartile range], mean (extreme)* or the frequency (percentage). ^an=40

GnRH = gonadotropin-releasing hormone, COS = control ovarian stimulation, rFSH = recombinant follicle-stimulating hormone; HMG = human menopausal gonadotropin; E2 = oestradiol; hCG = human chorionic gonadotropin; ICSI= Intra cytoplasmic sperm injection

Table 3: Follicular hormonal levels and prevalence of antithyroid antibodies in the FF, according to pregnancy

	Pregnancy (n = 25 cycles)	No pregnancy (n = 35 cycles)	p
Somatotropic axis:			
- GH (mIU/L)	4.50 [2.17; 6.36]	2.84 [1.18; 4.85]	0.099
- IGF1 (ng/mL)	70.2 [34.3; 97.1]	64.5 [28.6; 88.4]	0.42
25OHD (ng/ml)	29.6 [21.7; 38.8]	20.6 [15.6; 27.0]	0.017
Thyroid function and immunity			
- TSH (mIU/l)	1.20 [0.730; 1.77]	1.31 [0.864; 1.93]	0.63
- fT3 (pmol/l)	3.56 [3.10; 4.00]	3.80 [3.00; 4.19]	0.54
- fT4 (ng/dl)	1.10 [1.04; 1.14]	1.09 [1.01; 1.20]	0.99
- Anti-TPO antibodies ^a	0 (0%)	3 (14%)	0.23
- Anti-TG antibodies ^b	1 (5%)	2 (10%)	1

The data are expressed as the median [interquartile range] or the frequency (percentage). GH = growth hormone; IGF1 = insulin-like growth factor 1; 25OHD = 25-hydroxy vitamin D; TSH = thyroid-stimulating hormone; fT3 = free triiodothyronine; fT4 = free thyroxine; TPO = thyroperoxidase, TG = thyroglobulin.

Missing data: ^a n=19, ^b n=20

Perspectives

Afin de poursuivre ce projet de recherche, plusieurs travaux pourraient être menés. Tout d'abord, il serait utile de confirmer nos résultats actuels dans une cohorte plus large et d'associer pour chaque patiente un dosage sérique et folliculaire. Afin d'affiner l'analyse sur la qualité ovocytaire, il serait intéressant d'évaluer les concentrations hormonales folliculaires en fonction des différents types d'anomalies morphologiques ovocytaires et ce de façon individuelle et non poolée dans une cohorte. De plus, l'évaluation des anomalies morphologiques des ovocytes et des issues de tentatives en FIV chez les femmes présentant un déficit hormonal pourrait être informative. Cependant, ce type d'étude ne serait pas éthiquement réalisable chez les femmes souffrant d'hypothyroïdie, l'euthyroïdie en début de grossesse étant indispensable au développement fœtal. Mais il pourrait être utile d'étudier et de substituer systématiquement par GH les patientes présentant un GHD avant FIV afin d'améliorer la qualité ovocytaire et les chances de grossesse.

Par ailleurs, il pourrait être utile d'évaluer l'effet d'un traitement adjuvant par GH en FIV chez les patientes présentant une altération importante de la qualité ovocytaire.

Enfin, des expériences sur des modèles animaux pourraient être menées pour évaluer l'impact des déficits hormonaux sur la qualité ovocytaire.

Pour valoriser ce travail de thèse, les résultats de la revue de littérature devrait faire l'objet d'un article de synthèse pour les différents axes hormonaux étudiés .

Conclusion

L'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer les concentrations hormonales du LF ovarien en TSH, T3L, T4L, GH, IGF1, 25(OH)D, la présence des anticorps anti-TPO et anti-TG et les associations possibles entre leurs concentrations et les différents paramètres de FIV et d'ICSI.

Les hormones TSH, T3L, T4L, GH, IGF1, 25(OH)D, et les anticorps anti-TPO et anti-TG ont été détectés dans les LF ovariens issus de follicules matures en FIV. Une corrélation positive a été démontrée entre les taux sériques et folliculaires pour les hormones TSH, T3L, T4L, IGF1, 25(OH)D, et les anticorps anti-TPO et anti-TG. Nous n'avons pas mis en évidence cette corrélation pour la GH la différence étant probablement liée aux horaires différenciés des mesures.

Au vu des données de la littérature les HT, la GH et l'IGF1 semblent être des acteurs déterminants de la folliculogénèse et de l'ovogenèse. Cependant peu d'études portent sur la qualité ovocytaire. Lors de l'analyse d'une cohorte d'ovocytes issus d'ICSI, nous observons que des concentrations folliculaires plus élevées en GH et IGF1 sont associées à moins d'anomalies morphologiques ovocytaires, reflet d'une meilleure qualité ovocytaire. Cette association n'est pas observée pour les concentrations folliculaires en TSH, T3L, T4L, 25(OH)D et la présence d'ACAT. On observe par ailleurs que l'altération de la qualité ovocytaire entraîne une baisse de la compétence de l'ovocyte comme l'illustre la baisse du taux de fécondation dans la cohorte ovocytaire anormale. Cependant, les issues de tentatives ne sont pas impactées, soit par un manque de puissance de notre étude soit par une possible compensation de cette altération par le spermatozoïde permettant l'obtention d'un embryon de qualité suffisante pour obtenir une grossesse.

Les données de la littérature concernant l'association entre chances de grossesse après FIV et les concentrations sériques en TSH et 25(OH)D sont denses. Mais peu d'études portent sur les concentrations folliculaires hormonales. Nous observons que les chances de grossesse en FIV+/-ICSI après un transfert d'embryonnaire frais sont plus élevées si la concentration folliculaire en 25(OH)D est plus élevée. Cette association n'est pas observée pour les concentrations folliculaires en TSH, T3L, T4L, GH, IGF1 et la présence d'ACAT. Le rôle de la 25(OH)D dans la folliculogénèse et la stéroïdogénèse ovarienne n'est pas encore clairement explicité. L'amélioration des chances de grossesse pourrait être liée à une réduction de l'inflammation et le stress oxydatif. La 25(OH)D présente aussi des effets immunomodulateurs

pouvant contribuer à l'implantation. Une autre hypothèse serait que la 25(OH)D ne serait pas directement responsable des chances de grossesse, mais serait seulement le reflet d'un mode de vie plus sain par le biais d'une alimentation plus équilibrée et d'une activité physique en extérieur plus régulière.

Bibliographie

1. Ebner T, Moser M, Tews G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reprod Biomed Online*. 2006 Apr;12(4):507–12.
2. Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, et al. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril*. 2008 Nov;90(5):1692–700.
3. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1998 Dec;13(12):3431–3.
4. Sousa M, Cunha M, Silva J, Oliveira E, Pinho MJ, Almeida C, et al. Ultrastructural and cytogenetic analyses of mature human oocyte dysmorphisms with respect to clinical outcomes. *J Assist Reprod Genet*. 2016 Aug;33(8):1041–57.
5. de Cássia S Figueira R, de Almeida Ferreira Braga DP, Semião-Francisco L, Madaschi C, Iaconelli A, Borges E. Metaphase II human oocyte morphology: contributing factors and effects on fertilization potential and embryo developmental ability in ICSI cycles. *Fertil Steril*. 2010 Aug;94(3):1115–7.
6. Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. *Biol Reprod*. 2010 Jan 6;82(6):1021–9.
7. Ghanassia E, Fischer-Ghanassia P. *Endocrinologie, nutrition*. Vernazobres-Grego. 2007.
8. Chanson P, Young J. *Endocrinologie*. DOIN; 2000. (InterMed).
9. Dehkhoda F, Lee CMM, Medina J, Brooks AJ. The Growth Hormone Receptor: Mechanism of Receptor Activation, Cell Signaling, and Physiological Aspects. *Front Endocrinol [Internet]*. 2018 Feb 13
10. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol*. 2014 Mar 20;21(3):319–29.
11. Tissandé E, Guéguen Y, Lobaccaro J-MA, Aigueperse J, Souidi M. Vitamin D: metabolism, regulation and associated diseases. *Med Sci MS*. 2006 Dec;22(12):1095–100.
12. Liu W, Li H, Hao Y, Li Y, Lv M, Xue F, et al. Decreased immunosuppressive actions of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 in patients with immune thrombocytopenia. *Mol Immunol*. 2016 Oct;78:89–97.
13. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jul;96(7):1911–30.
14. Nitsa A, Toutouza M, Machairas N, Mariolis A, Philippou A, Koutsilieris M. Vitamin D in Cardiovascular Disease. *Vivo Athens Greece*. 2018 Oct;32(5):977–81.
15. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017 Jun;18(2):153–65.
16. Goldman S, Dirnfeld M, Abramovici H, Kraiem Z. Triiodothyronine and follicle-stimulating hormone, alone and additively together, stimulate production of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in cultured human luteinized granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Jun;82(6):1869–73.
17. Verga Falzacappa C, Mangialardo C, Patriarca V, Bucci B, Amendola D, Raffa S, et al. Thyroid hormones induce cell proliferation and survival in ovarian granulosa cells COV434. *J Cell Physiol*. 2009 Oct;221(1):242–53.
18. Datta M, Roy P, Banerjee J, Bhattacharya S. Thyroid hormone stimulates progesterone release from human luteal cells by generating a proteinaceous factor. *J Endocrinol*. 1998 Sep;158(3):319–25.
19. Wakim AN, Polizotto SL, Burholt DR. Augmentation by thyroxine of human granulosa cell gonadotrophin-induced steroidogenesis. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1995 Nov;10(11):2845–8.
20. Chandrashekar V, Zaczek D, Bartke A. The consequences of altered somatotrophic system on reproduction. *Biol Reprod*. 2004 Jul;71(1):17–27.
21. Karamouti M, Kollia P, Kallitsaris A, Vamvakopoulos N, Kollios G, Messinis IE. Growth hormone, insulin-like growth factor I, and leptin interaction in human cultured lutein granulosa cells steroidogenesis. *Fertil Steril*. 2008 Oct;90(4 Suppl):1444–50.
22. Xu J, Lawson MS, Xu F, Du Y, Tkachenko OY, Bishop CV, et al. Vitamin D3 Regulates Follicular Development and Intrafollicular Vitamin D Biosynthesis and Signaling in the Primate Ovary. *Front Physiol*. 2018;9:1600.
23. Xu J, Hennebold JD, Seifer DB. Direct vitamin D3 actions on rhesus macaque follicles in three-dimensional culture: assessment of follicle survival, growth, steroid, and antimüllerian hormone production. *Fertil Steril*. 2016 Dec;106(7):1815–1820.e1.
24. Xia P, Younglai EV. Relationship between steroid concentrations in ovarian follicular fluid and oocyte morphology in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment. *J Reprod Fertil*. 2000 Mar;118(2):229–33.
25. Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev*. 2002 Apr;82(2):473–502.
26. Colella M, Cuomo D, Giacco A, Mallardo M, De Felice M, Ambrosino C. Thyroid Hormones and

- Functional Ovarian Reserve: Systemic vs. Peripheral Dysfunctions. *J Clin Med*. 2020 Jun 1;9(6).
27. Poppe K, Velkeniers B, Glinooer D. Thyroid disease and female reproduction. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007 Mar;66(3):309–21.
 28. De Palo EF, De Filippis V, Gatti R, Spinella P. Growth hormone isoforms and segments/fragments: molecular structure and laboratory measurement. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2006 Feb;364(1–2):67–76.
 29. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996 Aug 16;273(5277):974–7.
 30. Ueberberg B, Unger N, Saeger W, Mann K, Petersenn S. Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme*. 2009 Nov;41(11):814–21.
 31. Irani M, Merhi Z. Role of vitamin D in ovarian physiology and its implication in reproduction: a systematic review. *Fertil Steril*. 2014 Aug;102(2):460–468.e3.
 32. De Silva M. Detection and measurement of thyroid stimulating hormone in human follicular fluid. *J Reprod Med*. 1994 Sep;39(9):679–80.
 33. Medenica S, Garalejic E, Arsic B, Medjo B, Bojovic Jovic D, Abazovic D, et al. Follicular fluid thyroid autoantibodies, thyrotropin, free thyroxine levels and assisted reproductive technology outcome. *PloS One*. 2018;13(10):e0206652.
 34. Cai YY, Lin N, Zhong LP, Duan HJ, Dong YH, Wu Z, et al. Serum and follicular fluid thyroid hormone levels and assisted reproductive technology outcomes. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2019 Nov 7;17(1):90.
 35. Aghajanova L, Lindeberg M, Carlsson IB, Stavreus-Evers A, Zhang P, Scott JE, et al. Receptors for thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*. 2009 Mar;18(3):337–47.
 36. Agard JA, Duffy DM, Jacot T, Archer DF. Thyroid stimulating hormone (TSH) receptor on granulosa cells. *Fertil Steril*. 2011 Sep;96(3, Supplement):S118.
 37. Wakim AN, Polizotto SL, Burholt DR. Alpha-1 and beta-1 thyroid hormone receptors on human granulosa cells. *Recent Prog Horm Res*. 1994;49:377–81.
 38. Zhang SS, Carrillo AJ, Darling DS. Expression of multiple thyroid hormone receptor mRNAs in human oocytes, cumulus cells, and granulosa cells. *Mol Hum Reprod*. 1997 Jul;3(7):555–62.
 39. Cedíková M, Babuška V, Rajdl D, Zech NH, Kališ V, Králíčková M. [Comparison of prolactin, free T3 and free T4 levels in the follicular fluid of infertile women and healthy fertile oocyte donors]. *Ceská Gynekol Česká Lékařská Společnost J Ev Purkyne*. 2012 Oct;77(5):471–6.
 40. Rae MT, Gubbay O, Kostogiannou A, Price D, Critchley HOD, Hillier SG. Thyroid hormone signaling in human ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jan;92(1):322–7.
 41. Wakim AN, Paljug WR, Jasnosz KM, Alhakim N, Brown AB, Burholt DR. Thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in human granulosa and ovarian stromal cells. *Fertil Steril*. 1994 Sep;62(3):531–4.
 42. López Navarro E, Ortega FJ, Francisco-Busquets E, Sabater-Masdeu M, Álvarez-Castaño E, Ricart W, et al. Thyroid Hormone Receptors Are Differentially Expressed in Granulosa and Cervical Cells of Infertile Women. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc*. 2016 Mar;26(3):466–73.
 43. Monteleone P, Faviana P, Artini PG. Thyroid peroxidase identified in human granulosa cells: another piece to the thyroid-ovary puzzle? *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2017 Jul;33(7):574–6.
 44. Monteleone P, Parrini D, Faviana P, Carletti E, Casarosa E, Uccelli A, et al. Female infertility related to thyroid autoimmunity: the ovarian follicle hypothesis. *Am J Reprod Immunol N Y N 1989*. 2011 Aug;66(2):108–14.
 45. Artini PG, Battaglia C, D'Ambrogio G, Barreca A, Droghini F, Volpe A, et al. Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1994 May;9(5):902–6.
 46. Amato G, Izzo A, Tucker A, Bellastella A. Insulin-like growth factor binding protein-3 reduction in follicular fluid in spontaneous and stimulated cycles. *Fertil Steril*. 1998 Jul;70(1):141–4.
 47. Barreca A, Minuto F, Volpe A, Cecchelli E, Cella F, Del Monte P, et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I binding protein in the follicular fluids of growth hormone treated patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1990 Apr;32(4):497–505.
 48. Amato G, Izzo A, Tucker AT, Bellastella A. Lack of insulin-like growth factor binding protein-3 variation after follicle-stimulating hormone stimulation in women with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1999 Sep;72(3):454–7.
 49. Li L, Ferin M, Sauer MV, Lobo RA. Serum and follicular fluid ghrelin levels negatively reflect human oocyte quality and in vitro embryo development. *Fertil Steril*. 2011 Nov;96(5):1116–20.
 50. Jesionowska H, Hemmings R, Guyda HJ, Posner BI. Determination of insulin and insulin-like growth factors in the ovarian circulation. *Fertil Steril*. 1990 Jan;53(1):88–91.
 51. Tesarik J, Hazout A, Mendoza C. Improvement of delivery and live birth rates after ICSI in women aged >40 years by ovarian co-stimulation with growth hormone. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2005 Sep;20(9):2536–41.
 52. Volpe A, Coukos G, Barreca A, Artini PG, Minuto F, Giordano G, et al. Ovarian response to combined growth hormone-gonadotropin treatment in patients resistant to induction of superovulation. *Gynecol Endocrinol*

- Off J Int Soc Gynecol Endocrinol. 1989 Jun;3(2):125–33.
53. Huang ZH, Baxter RC, Hughes SM, Matson PL, Lieberman BA, Morris ID. Supplementary growth hormone treatment of women with poor ovarian response to exogenous gonadotrophins: changes in serum and follicular fluid insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF binding protein-3 (IGFBP-3). *Hum Reprod Oxf Engl.* 1993 Jun;8(6):850–7.
 54. Bergh C, Hillensjö T, Wikland M, Nilsson L, Borg G, Hamberger L. Adjuvant growth hormone treatment during in vitro fertilization: a randomized, placebo-controlled study. *Fertil Steril.* 1994 Jul;62(1):113–20.
 55. Howles CM, Loumaye E, Germond M, Yates R, Brinsden P, Healy D, et al. Does growth hormone-releasing factor assist follicular development in poor responder patients undergoing ovarian stimulation for in-vitro fertilization? *Hum Reprod Oxf Engl.* 1999 Aug;14(8):1939–43.
 56. Ob'edkova K, Kogan I, Krikheli I, Dzhemlikhanova L, Muller V, Mekina I, et al. Growth hormone co-treatment in IVF/ICSI cycles in poor responders. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol.* 2017;33(sup1):15–7.
 57. Abir R, Garor R, Felz C, Nitke S, Krissi H, Fisch B. Growth hormone and its receptor in human ovaries from fetuses and adults. *Fertil Steril.* 2008 Oct;90(4 Suppl):1333–9.
 58. Schwärzler P, Untergasser G, Hermann M, Dirrhofer S, Abendstein B, Madersbacher S, et al. Selective growth hormone/placental lactogen gene transcription and hormone production in pre- and postmenopausal human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Oct;82(10):3337–41.
 59. Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, et al. Immunohistochemical localization of growth hormone receptor in cyclic human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Feb;88(2):879–87.
 60. Ménézo YJ, el Mouatassim S, Chavier M, Servy EJ, Nicolet B. Human oocytes and preimplantation embryos express mRNA for growth hormone receptor. *Zygote Camb Engl.* 2003 Nov;11(4):293–7.
 61. Geisthoevel F, Moretti-Rojas IM, Rojas FJ, Asch RH. Immunoreactive insulin-like growth factor I in human follicular fluid. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1989 Jan;4(1):35–8.
 62. Rabinovici J, Dandekar P, Angle MJ, Rosenthal S, Martin MC. Insulin-like growth factor I (IGF-I) levels in follicular fluid from human preovulatory follicles: correlation with serum IGF-I levels. *Fertil Steril.* 1990 Sep;54(3):428–33.
 63. Klein NA, Battaglia DE, Miller PB, Branigan EF, Giudice LC, Soules MR. Ovarian follicular development and the follicular fluid hormones and growth factors in normal women of advanced reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 May;81(5):1946–51.
 64. Oosterhuis GJ, Vermes I, Lambalk CB, Michgelsen HW, Schoemaker J. Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 concentrations in fluid from human stimulated follicles. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1998 Feb;13(2):285–9.
 65. Owen EJ, Torresani T, West C, Mason BA, Jacobs HS. Serum and follicular fluid insulin like growth factors I and II during growth hormone co-treatment for in-vitro fertilization and embryo transfer. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1991 Oct;35(4):327–34.
 66. Eden JA, Jones J, Carter GD, Alagband-Zadeh J. A comparison of follicular fluid levels of insulin-like growth factor-1 in normal dominant and cohort follicles, polycystic and multicystic ovaries. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1988 Sep;29(3):327–36.
 67. Hamori M, Blum WF, Török A, Stehle R, Waibel E, Cledon P, et al. Insulin-like growth factors and their binding proteins in human follicular fluid. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1991 Mar;6(3):313–8.
 68. Pellegrini S, Fuzzi B, Pratesi S, Mannelli M, Criscuoli L, Messeri G, et al. In-vivo studies on ovarian insulin-like growth factor I concentrations in human preovulatory follicles and human ovarian circulation. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1995 Jun;10(6):1341–5.
 69. Barreca A, Del Monte P, Ponzani P, Artini PG, Genazzani AR, Minuto F. Intrafollicular insulin-like growth factor-II levels in normally ovulating women and in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 1996 Apr;65(4):739–45.
 70. Thierry van Dessel HJ, Chandrasekher Y, Yap OW, Lee PD, Hintz RL, Faessen GH, et al. Serum and follicular fluid levels of insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding protein-1 and -3 during the normal menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Mar;81(3):1224–31.
 71. Seifer DB, Giudice LC, Dsupin BA, Haning RV, Frishman GN, Burger HG. Follicular fluid insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II concentrations vary as a function of day 3 serum follicle stimulating hormone. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1995 Apr;10(4):804–6.
 72. Kubota T, Kamada S, Ohara M, Taguchi M, Sakamoto S, Shimizu Y, et al. Insulin-like growth factor II in follicular fluid of the patients with in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril.* 1993 Apr;59(4):844–9.
 73. Chang SY, Hsieh KC, Wang HS, Soong YK. Follicular fluid levels of insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein I, and ovarian steroids collected during ovum pick-up. *Fertil Steril.* 1994 Dec;62(6):1162–7.
 74. Stadtmauer L, Vidali A, Lindheim SR, Sauer MV. Follicular fluid insulin-like growth factor-I and

- insulin-like growth factor-binding protein-1 and -3 vary as a function of ovarian reserve and ovarian stimulation. *J Assist Reprod Genet.* 1998 Nov;15(10):587–93.
75. Jimena P, Castilla JA, Peran F, Molina R, Ramirez JP, Acebal M, et al. Insulin and insulin-like growth factor I in follicular fluid after induction of ovulation in women undergoing in vitro fertilization. *J Reprod Fertil.* 1992 Nov;96(2):641–7.
 76. Wang T-H, Chang C-L, Wu H-M, Chiu Y-M, Chen C-K, Wang H-S. Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. *Fertil Steril.* 2006 Nov;86(5):1392–401.
 77. Ferrari B, Pezzuto A, Barusi L, Coppola F. Gonadotropin-releasing hormone antagonists increase follicular fluid insulin-like growth factor-I and vascular endothelial growth factor during ovarian stimulation cycles. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol.* 2006 Jun;22(6):289–96.
 78. Ulug U, Turan E, Tosun SB, Erden HF, Bahceci M. Comparison of preovulatory follicular concentrations of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, and inhibins A and B in women undergoing assisted conception treatment with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonists and GnRH antagonists. *Fertil Steril.* 2007 Apr;87(4):995–8.
 79. Fried G, Remaeus K, Harlin J, Krog E, Csemiczky G, Aanesen A, et al. Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-I/IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* 2003 May;20(5):167–76.
 80. Hughes SM, Huang ZH, Matson PL, Buck P, Lieberman BA, Morris ID. Clinical and endocrinological changes in women following ovulation induction using buserelin acetate/human menopausal gonadotrophin augmented with biosynthetic human growth hormone. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1992 Jul;7(6):770–5.
 81. Volpe A, Artini PG, Barreca A, Minuto F, Coukos G, Genazzani AR. Effects of growth hormone administration in addition to gonadotrophins in normally ovulating women and polycystic ovary syndrome (PCO) patients. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1992 Nov;7(10):1347–52.
 82. Owen EJ, West C, Mason BA, Jacobs HS. Co-treatment with growth hormone of sub-optimal responders in IVF-ET. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1991 Apr;6(4):524–8.
 83. Choe S-A, Kim MJ, Lee HJ, Kim J, Chang EM, Kim JW, et al. Increased proportion of mature oocytes with sustained-release growth hormone treatment in poor responders: a prospective randomized controlled study. *Arch Gynecol Obstet.* 2018 Mar;297(3):791–6.
 84. Zhou J, Bondy C. Anatomy of the human ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod.* 1993 Mar;48(3):467–82.
 85. Kwon H, Choi D-H, Bae J-H, Kim J-H, Kim Y-S. mRNA expression pattern of insulin-like growth factor components of granulosa cells and cumulus cells in women with and without polycystic ovary syndrome according to oocyte maturity. *Fertil Steril.* 2010 Nov;94(6):2417–20.
 86. el-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, LeRoith D, Roberts CT, Yen SS. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 Nov;77(5):1411–8.
 87. Hernandez ER, Hurwitz A, Vera A, Pellicer A, Adashi EY, LeRoith D, et al. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 Feb;74(2):419–25.
 88. Voutilainen R, Franks S, Mason HD, Martikainen H. Expression of insulin-like growth factor (IGF), IGF-binding protein, and IGF receptor messenger ribonucleic acids in normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Mar;81(3):1003–8.
 89. Lighten AD, Hardy K, Winston RM, Moore GE. Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 1997 Jun;47(2):134–9.
 90. Liu HC, He ZY, Mele CA, Veeck LL, Davis OK, Rosenwaks Z. Expression of IGFs and their receptors is a potential marker for embryo quality. *Am J Reprod Immunol N Y N 1989.* 1997 Oct;38(4):237–45.
 91. Ramasharma K, Cabrera CM, Li CH. Identification of insulin-like growth factor-II in human seminal and follicular fluids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 Oct 30;140(2):536–42.
 92. Peñarrubia J, Balasch J, García-Bermúdez M, Casamitjana R, Vanrell JA, Hernandez ER. Growth hormone does not increase the expression of insulin-like growth factors and their receptor genes in the premenopausal human ovary. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2000 Jun;15(6):1241–6.
 93. Geisthovel F, Moretti-Rojas I, Asch RH, Rojas FJ. Expression of insulin-like growth factor-II (IGF-II) messenger ribonucleic acid (mRNA), but not IGF-I mRNA, in human preovulatory granulosa cells. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1989 Nov;4(8):899–902.
 94. Chang SY, Tsai M-Y, Huang F-J, Kung F-T. Expression of insulin-like growth factor (IGF), IGF receptor, and IGF-binding protein messenger ribonucleic acids in luteinized granulosa cells from different size follicles after controlled ovarian hyperstimulation. *J Assist Reprod Genet.* 2002 Mar;19(3):121–6.
 95. Nagamani M, Stuart CA. Specific binding sites for insulin-like growth factor I in the ovarian stroma of women with polycystic ovarian disease and stromal hyperthecosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1990 Dec;163(6 Pt 1):1992–7.
 96. Qu J, Godin PA, Nisolle M, Donnez J. Expression of receptors for insulin-like growth factor-I and

- transforming growth factor-beta in human follicles. *Mol Hum Reprod*. 2000 Feb;6(2):137–45.
97. Samoto T, Maruo T, Matsuo H, Katayama K, Barnea ER, Mochizuki M. Altered expression of insulin and insulin-like growth factor-I receptors in follicular and stromal compartments of polycystic ovaries. *Endocr J*. 1993 Aug;40(4):413–24.
 98. Poretsky L, Bhargava G, Levitan E. Type I insulin-like growth factor receptors in human ovarian stroma. *Horm Res*. 1990;33(1):22–6.
 99. Balboni GC, Vannelli GB, Barni T, Orlando C, Serio M. Transferrin and somatomedin C receptors in the human ovarian follicles. *Fertil Steril*. 1987 Nov;48(5):796–801.
 100. Bergh C, Carlsson B, Olsson JH, Selleskog U, Hillensjö T. Regulation of androgen production in cultured human thecal cells by insulin-like growth factor I and insulin. *Fertil Steril*. 1993 Feb;59(2):323–31.
 101. Poretsky L, Grigorescu F, Seibel M, Moses AC, Flier JS. Distribution and characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptors in normal human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985 Oct;61(4):728–34.
 102. De Neubourg D, Robins A, Fishel S, Delbeke L. Quantification of insulin-like growth factor I receptors on granulosa cells with flow cytometry after follicular stimulation. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1998 Jan;13(1):161–4.
 103. Gates GS, Bayer S, Seibel M, Poretsky L, Flier JS, Moses AC. Characterization of insulin-like growth factor binding to human granulosa cells obtained during in vitro fertilization. *J Recept Res*. 1987;7(6):885–902.
 104. Shifren JL, Osathanondh R, Yeh J. Human fetal ovaries and uteri: developmental expression of genes encoding the insulin, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor II receptors. *Fertil Steril*. 1993 May;59(5):1036–40.
 105. Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Rosenfeld RG. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) and IGFBP-2 in human follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990 Nov;71(5):1330–8.
 106. Hartshorne GM, Bell SC, Waites GT. Binding proteins for insulin-like growth factors in the human ovary: identification, follicular fluid levels and immunohistological localization of the 29-32 kd type 1 binding protein, IGF-bp1. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1990 Aug;5(6):649–60.
 107. Chandrasekher YA, Van Dessel HJ, Fauser BC, Giudice LC. Estrogen- but not androgen-dominant human ovarian follicular fluid contains an insulin-like growth factor binding protein-4 protease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Sep;80(9):2734–9.
 108. San Roman GA, Magoffin DA. Insulin-like growth factor-binding proteins in healthy and atretic follicles during natural menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Mar;76(3):625–32.
 109. Holly JM, Eden JA, Alaghband-Zadeh J, Carter GD, Jemmott RC, Cianfarani S, et al. Insulin-like growth factor binding proteins in follicular fluid from normal dominant and cohort follicles, polycystic and multicystic ovaries. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1990 Jul;33(1):53–64.
 110. Schuller AG, Lindenbergh-Kortleve DJ, Pache TD, Zwarthoff EC, Fauser BC, Drop SL. Insulin-like growth factor binding protein-2, 28 kDa and 24 kDa insulin-like growth factor binding protein levels are decreased in fluid of dominant follicles, obtained from normal and polycystic ovaries. *Regul Pept*. 1993 Oct 20;48(1–2):157–63.
 111. Cataldo NA, Giudice LC. Insulin-like growth factor binding protein profiles in human ovarian follicular fluid correlate with follicular functional status. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991 Apr;74(4):821–9.
 112. el-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, Shimasakai S, Ling N, LeRoith D, et al. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1–6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Jun;78(6):1488–96.
 113. Cwyfan Hughes S, Mason HD, Franks S, Holly JM. Modulation of the insulin-like growth factor-binding proteins by follicle size in the human ovary. *J Endocrinol*. 1997 Jul;154(1):35–43.
 114. Koistinen R, Suikkari AM, Tiitinen A, Kontula K, Seppälä M. Human granulosa cells contain insulin-like growth factor-binding protein (IGF BP-1) mRNA. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1990 May;32(5):635–40.
 115. Firouzabadi RD, Rahmani E, Rahsepar M, Firouzabadi MM. Value of follicular fluid vitamin D in predicting the pregnancy rate in an IVF program. *Arch Gynecol Obstet*. 2014 Jan;289(1):201–6.
 116. Ozkan S, Jindal S, Greenseid K, Shu J, Zeitlian G, Hickmon C, et al. Replete vitamin D stores predict reproductive success following in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010 Sep;94(4):1314–9.
 117. Merhi Z, Doswell A, Krebs K, Cipolla M. Vitamin D alters genes involved in follicular development and steroidogenesis in human cumulus granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Jun;99(6):E1137–1145.
 118. Anifandis GM, Dafopoulos K, Messini CI, Chalvatzas N, Liakos N, Pournaras S, et al. Prognostic value of follicular fluid 25-OH vitamin D and glucose levels in the IVF outcome. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2010 Jul 28;8:91.
 119. Bednarska-Czerwińska A, Olszak-Wąsik K, Olejek A, Czerwiński M, Tukiendorf AA. Vitamin D and Anti-Müllerian Hormone Levels in Infertility Treatment: The Change-Point Problem. *Nutrients*. 2019 May 10;11(5).
 120. Makieva S, Reschini M, Ferrari S, Bonesi F, Polledri E, Fustinoni S, et al. Oral Vitamin D supplementation impacts gene expression in granulosa cells in women undergoing IVF. *Hum Reprod Oxf Engl*.

2021 Jan 1;36(1):130–44.

121. Arnanz A, De Munck N, El Khatib I, Bayram A, Abdala A, Melado L, et al. Vitamin D in Follicular Fluid Correlates With the Euploid Status of Blastocysts in a Vitamin D Deficient Population. *Front Endocrinol*. 2020;11:609524.
122. Liu X, Zhang W, Xu Y, Chu Y, Wang X, Li Q, et al. Effect of vitamin D status on normal fertilization rate following in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2019 Jul 18;17(1):59.
123. Aleyasin A, Hosseini MA, Mahdavi A, Safdarian L, Fallahi P, Mohajeri MR, et al. Predictive value of the level of vitamin D in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive technology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011 Nov;159(1):132–7.
124. Masjedi F, Keshtgar S, Agah F, Karbalaeei N. Association Between Sex Steroids and Oxidative Status with Vitamin D Levels in Follicular Fluid of Non-obese PCOS and Healthy Women. *J Reprod Infertil*. 2019 Sep;20(3):132–42.
125. Potashnik G, Lunenfeld E, Levitas E, Itskovitz J, Albutiano S, Yankowitz N, et al. The relationship between endogenous oestradiol and vitamin D3 metabolites in serum and follicular fluid during ovarian stimulation for in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1992 Nov;7(10):1357–60.
126. Ciepiela P, Dulęba AJ, Kowaleczko E, Chełstowski K, Kurzawa R. Vitamin D as a follicular marker of human oocyte quality and a serum marker of in vitro fertilization outcome. *J Assist Reprod Genet*. 2018 Jul;35(7):1265–76.
127. Parikh G, Varadinova M, Suwandhi P, Araki T, Rosenwaks Z, Poretsky L, et al. Vitamin D regulates steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) production in human ovarian cells. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab*. 2010 Sep;42(10):754–7.
128. Thill M, Becker S, Fischer D, Cordes T, Hornemann A, Diedrich K, et al. Expression of prostaglandin metabolising enzymes COX-2 and 15-PGDH and VDR in human granulosa cells. *Anticancer Res*. 2009 Sep;29(9):3611–8.
129. Wang F, Chang H-M, Yi Y, Lin Y-M, Li H, Leung PCK. TGF- β 1 promotes vitamin D-induced prostaglandin E2 synthesis by upregulating vitamin D receptor expression in human granulosa-lutein cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2020 May 1;318(5):E710–22.
130. Bandyopadhyay A, Roy P, Bhattacharya S. Thyroid hormone induces the synthesis of a putative protein in the rat granulosa cell which stimulates progesterone release. *J Endocrinol*. 1996 Aug;150(2):309–18.
131. Zhang C, Guo L, Zhu B, Feng Y, Yu S, An N, et al. Effects of 3, 5, 3'-triiodothyronine (t3) and follicle stimulating hormone on apoptosis and proliferation of rat ovarian granulosa cells. *Chin J Physiol*. 2013 Oct 31;56(5):298–305.
132. Zhang C, Xia G, Tsang BK. Interactions of thyroid hormone and FSH in the regulation of rat granulosa cell apoptosis. *Front Biosci Elite Ed*. 2011;3:1401–13.
133. Wongbandue G, Jewgenow K, Chatdarong K. Effects of thyroxin (T4) and activin A on in vitro growth of preantral follicles in domestic cats. *Theriogenology*. 2013 Mar 15;79(5):824–32.
134. Asahara S, Sato A, Aljonaid AA, Maruo T. Thyroid hormone synergizes with follicle stimulating hormone to inhibit apoptosis in porcine granulosa cells selectively from small follicles. *Kobe J Med Sci*. 2003;49(5–6):107–16.
135. Hayashi M, Maruo T, Matsuo H, Mochizuki M. The biocellular effect of thyroid hormone on functional differentiation of porcine granulosa cells in culture. *Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi*. 1985 Oct 20;61(10):1189–96.
136. Maruo T, Hayashi M, Matsuo H, Yamamoto T, Okada H, Mochizuki M. The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in the functional differentiation of cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology*. 1987 Oct;121(4):1233–41.
137. Maruo T, Hiramatsu S, Otani T, Hayashi M, Mochizuki M. Increase in the expression of thyroid hormone receptors in porcine granulosa cells early in follicular maturation. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1992 Aug;127(2):152–60.
138. Di Paolo V, Mangialardo C, Zacà C, Barberi M, Sereni E, Borini A, et al. Thyroid hormones T3 and T4 regulate human luteinized granulosa cells, counteracting apoptosis and promoting cell survival. *J Endocrinol Invest*. 2020 Jun;43(6):821–31.
139. Dijkstra G, de Rooij DG, de Jong FH, van den Hurk R. Effect of hypothyroidism on ovarian follicular development, granulosa cell proliferation and peripheral hormone levels in the prepubertal rat. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc*. 1996 May;134(5):649–54.
140. Armada-Dias L, Carvalho JJ, Breitenbach MM, Franci CR, Moura EG. Is the infertility in hypothyroidism mainly due to ovarian or pituitary functional changes? *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al*. 2001 Sep;34(9):1209–15.
141. Chan WY, Ng TB. Effect of hypothyroidism induced by propylthiouracil and thiourea on male and female reproductive systems of neonatal mice. *J Exp Zool*. 1995 Oct 1;273(2):160–9.
142. Fedail JS, Zheng K, Wei Q, Kong L, Shi F. Roles of thyroid hormones in follicular development in the ovary of neonatal and immature rats. *Endocrine*. 2014 Aug;46(3):594–604.
143. Zheng K, Sulieman FJ, Li J, Wei Q, Xu M, Shi F. Nitric oxide and thyroid hormone receptor alpha 1

- contribute to ovarian follicular development in immature hyper- and hypo-thyroid rats. *Reprod Biol*. 2015 Mar;15(1):27–33.
144. Hatsuta M, Abe K, Tamura K, Ryuno T, Watanabe G, Taya K, et al. Effects of hypothyroidism on the estrous cycle and reproductive hormones in mature female rat. *Eur J Pharmacol*. 2004 Feb 23;486(3):343–8.
 145. Fitko R, Szlezzyngier B. Role of thyroid hormone in controlling the concentration of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in rat ovaries. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc*. 1994 Apr;130(4):378–80.
 146. Mattheij JA, Swarts JJ, Lokerse P, van Kampen JT, Van der Heide D. Effect of hypothyroidism on the pituitary-gonadal axis in the adult female rat. *J Endocrinol*. 1995 Jul;146(1):87–94.
 147. Ortega E, Rodriguez E, Ruiz E, Osorio C. Activity of the hypothalamo-pituitary ovarian axis in hypothyroid rats with or without triiodothyronine replacement. *Life Sci*. 1990;46(6):391–5.
 148. Meng L, Rijntjes E, Swarts HJM, Keijer J, Teerds KJ. Prolonged hypothyroidism severely reduces ovarian follicular reserve in adult rats. *J Ovarian Res*. 2017 Mar 16;10(1):19.
 149. FREDRIKSON H, RYDIN H. The thyroid-ovarian correlation in the rabbit. *Acta Physiol Scand*. 1947 Sep 30;14(1–2):136–43.
 150. Hapon MB, Gamarra-Luques C, Jahn GA. Short term hypothyroidism affects ovarian function in the cycling rat. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2010;8:14.
 151. Sato E, Jiang JY. Follicular development and ovulation in hypothyroid rdw rats. *Ital J Anat Embryol Arch Ital Anat Ed Embriologia*. 2001;106(2 Suppl 2):249–56.
 152. Joshi JV, Bhandarkar SD, Chadha M, Balaiah D, Shah R. Menstrual irregularities and lactation failure may precede thyroid dysfunction or goitre. *J Postgrad Med*. 1993 Sep;39(3):137–41.
 153. Krassas GE, Pontikides N, Kaltsas T, Papadopoulou P, Paunkovic J, Paunkovic N, et al. Disturbances of menstruation in hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999 May;50(5):655–9.
 154. Tuten A, Hatipoglu E, Oncul M, Imamoglu M, Acikgoz AS, Yilmaz N, et al. Evaluation of ovarian reserve in Hashimoto's thyroiditis. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2014 Oct;30(10):708–11.
 155. Mehendale RG, Bruot BC. Thyroid stimulating hormone inhibits rat granulosa cell steroidogenesis in primary culture. *Endocrine*. 1995 Mar;3(3):215–20.
 156. Hayashi M, Maruo T, Matsuo H, Mochizuki M. [Effect of thyroid hormone on steroidogenic enzyme induction in porcine granulosa cells cultured in vitro]. *Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi*. 1987 Oct 20;63(10):1231–40.
 157. Spicer LJ, Alonso J, Chamberlain CS. Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins. *J Dairy Sci*. 2001 May;84(5):1069–76.
 158. Gregoraszcuk EL, Skalka M. Thyroid hormone as a regulator of basal and human chorionic gonadotrophin-stimulated steroidogenesis by cultured porcine theca and granulosa cells isolated at different stages of the follicular phase. *Reprod Fertil Dev*. 1996;8(6):961–7.
 159. Cyr DG, Eales JG. In vitro effects of thyroid hormones on gonadotropin-induced estradiol-17 β secretion by ovarian follicles of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen Comp Endocrinol*. 1988 Jan;69(1):80–7.
 160. Liu J, Tian Y, Ding Y, Heng D, Xu K, Liu W, et al. Role of CYP51 in the Regulation of T3 and FSH-Induced Steroidogenesis in Female Mice. *Endocrinology*. 2017 Nov 1;158(11):3974–87.
 161. Gregoraszcuk EL, Kolodziejczyk J, Rzyasa J. Triiodothyronine stimulates 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the porcine corpus luteum. *Endocr Regul*. 1999 Dec;33(4):155–60.
 162. Chan WK, Tan CH. Inhibition of follicle-stimulating hormone induction of aromatase activity in porcine granulosa cells by thyroxine and triiodothyronine. *Endocrinology*. 1986 Nov;119(5):2353–9.
 163. Cecconi S, Rucci N, Scaldaferrri ML, Masciulli MP, Rossi G, Moretti C, et al. Thyroid hormone effects on mouse oocyte maturation and granulosa cell aromatase activity. *Endocrinology*. 1999 Apr;140(4):1783–8.
 164. Hatsuta M, Tamura K, Shimizu Y, Toda K, Kogo H. Effect of thyroid hormone on CYP19 expression in ovarian granulosa cells from gonadotropin-treated immature rats. *J Pharmacol Sci*. 2004 Apr;94(4):420–5.
 165. Gregoraszcuk EL, Slomczynska M, Wilk R. Thyroid hormone inhibits aromatase activity in porcine thecal cells cultured alone and in coculture with granulosa cells. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc*. 1998 Dec;8(12):1157–63.
 166. Gregoraszcuk EL. Is thyroid hormone a modulator of estrogen receptor in porcine follicular cells? *Endocr Regul*. 2000 Sep;34(3):151–5.
 167. Wakim AN, Polizotto SL, Burholt DR. Influence of thyroxine on human granulosa cell steroidogenesis in vitro. *J Assist Reprod Genet*. 1995 Apr;12(4):274–7.
 168. Slebodziński AB. Ovarian iodide uptake and triiodothyronine generation in follicular fluid. The enigma of the thyroid ovary interaction. *Domest Anim Endocrinol*. 2005 Jul;29(1):97–103.
 169. Weng X, Ma X, Wang Q, Xu K, Hu X, Liu W, et al. Effect of hypothyroidism on CYP51 and FSHR expression in rat ovary. *Theriogenology*. 2019 Oct 15;138:145–51.
 170. Tohei A, Imai M, Watanabe G, Taya K. Influence of thiouracil-induced hypothyroidism on adrenal and gonadal functions in adult female rats. *J Vet Med Sci*. 1998 Apr;60(4):439–46.
 171. Taher BM, Ghariabeh RA, Jarrah NS, Hadidy AM, Radaideh AM, Ajlouni KM. Spontaneous ovarian

- hyperstimulation syndrome caused by hypothyroidism in an adult. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004 Jan 15;112(1):107–9.
172. Honbo KS, van Herle AJ, Kellett KA. Serum prolactin levels in untreated primary hypothyroidism. *Am J Med.* 1978 May;64(5):782–7.
173. Dittrich R, Beckmann MW, Oppelt PG, Hoffmann I, Lotz L, Kuwert T, et al. Thyroid hormone receptors and reproduction. *J Reprod Immunol.* 2011 Jun;90(1):58–66.
174. Krassas GE. Thyroid disease and female reproduction. *Fertil Steril.* 2000 Dec;74(6):1063–70.
175. Valenti G, Ceda GP, Denti L, Tarditi E, Speroni G. Gonadotropin secretion in hyperthyroidism and hypothyroidism. *Ric Clin Lab.* 1984 Mar;14(1):53–63.
176. Krassas GE, Poppe K, Glinioer D. Thyroid function and human reproductive health. *Endocr Rev.* 2010 Oct;31(5):702–55.
177. Gordon GG, Southren AL. Thyroid - hormone effects on steroid - hormone metabolism. *Bull N Y Acad Med.* 1977 Apr;53(3):241–59.
178. Longcope C, Abend S, Braverman LE, Emerson CH. Androstenedione and estrone dynamics in hypothyroid women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990 Apr;70(4):903–7.
179. De Silva M, Pearl AW, Butler WJ. Thyroid stimulating hormone causes cumulus expansion in mouse oocytes. *Theriogenology.* 1994;41(4):899–905.
180. van der Ven LTM, van den Brandhof E-J, Vos JH, Power DM, Wester PW. Effects of the antithyroid agent propylthiouracil in a partial life cycle assay with zebrafish. *Environ Sci Technol.* 2006 Jan 1;40(1):74–81.
181. Bernal A, DeMoraes GV, Thrift TA, Willard CC, Randel RD. Effects of induced hypothyroidism on ovarian response to superovulation in Brahman (*Bos indicus*) cows. *J Anim Sci.* 1999 Oct;77(10):2749–56.
182. Costa NN, Cordeiro MS, Silva TVG, Sastre D, Santana PPB, Sá ALA, et al. Effect of triiodothyronine on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology.* 2013 Sep 1;80(4):295–301.
183. Liu X, Andoh K, Yokota H, Kobayashi J, Abe Y, Yamada K, et al. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology.* 1998 May;139(5):2342–7.
184. Semiz O, Evirgen O. The effect of growth hormone on ovarian follicular response and oocyte nuclear maturation in young and aged mice. *Acta Histochem.* 2009;111(2):104–11.
185. Eckery DC, Moeller CL, Nett TM, Sawyer HR. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biol Reprod.* 1997 Sep;57(3):507–13.
186. Gong JG, Baxter G, Bramley TA, Webb R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *J Reprod Fertil.* 1997 May;110(1):91–7.
187. Jimenez CR, de Azevedo JL, Silveira RG, Penitente-Filho J, Carrascal-Triana EL, Zolini AM, et al. Effects of Growth Hormone on In Situ Culture of Bovine Preantral Follicles are Dose Dependent. *Reprod Domest Anim Zuchthyg.* 2016 Aug;51(4):575–84.
188. Kaiser GG, Kölle S, Boie G, Sinowatz F, Palma GA, Alberio RH. In vivo effect of growth hormone on the expression of connexin-43 in bovine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev.* 2006 May;73(5):600–6.
189. De la Sota RL, Lucy MC, Staples CR, Thatcher WW. Effects of recombinant bovine somatotropin (sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 1993 Apr;76(4):1002–13.
190. Sá Filho MF, Carvalho N a. T, Gimenes LU, Torres-Júnior JR, Nasser LFT, Tonhati H, et al. Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on in vitro buffalo embryo production. *Anim Reprod Sci.* 2009 Jul;113(1–4):51–9.
191. Kolodziejczyk J, Gertler A, Leibovich H, Rzaşa J, Gregoraszczyk EL. Synergistic action of growth hormone and insulin-like growth factor I (IGF-I) on proliferation and estradiol secretion in porcine granulosa and theca cells cultured alone or in coculture. *Theriogenology.* 2003 Aug;60(3):559–70.
192. Yoshimura Y, Nakamura Y, Koyama N, Iwashita M, Adachi T, Takeda Y. Effects of growth hormone on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril.* 1993 Apr;59(4):917–23.
193. Hrabia A, Sechman A, Gertler A, Rzaşa J. Effect of growth hormone on steroid content, proliferation and apoptosis in the chicken ovary during sexual maturation. *Cell Tissue Res.* 2011 Jul;345(1):191–202.
194. Martins FS, Celestino JJH, Saraiva MVA, Chaves RN, Rossetto R, Silva CMG, et al. Interaction between growth differentiation factor 9, insulin-like growth factor I and growth hormone on the in vitro development and survival of goat preantral follicles. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol.* 2010 Aug;43(8):728–36.
195. Kobayashi J, Mizunuma H, Kikuchi N, Liu X, Andoh K, Abe Y, et al. Morphological assessment of the effect of growth hormone on preantral follicles from 11-day-old mice in an in vitro culture system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Feb 5;268(1):36–41.
196. Sirotkin AV, Makarevich AV. GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of the cAMP/protein kinase A system. *J Endocrinol.* 1999 Nov;163(2):317–27.

197. Sirotkin AV, Makarevich AV. Growth hormone can regulate functions of porcine ovarian granulosa cells through the cAMP/protein kinase A system. *Anim Reprod Sci.* 2002 Mar 15;70(1–2):111–26.
198. Eisenhauer KM, Chun SY, Billig H, Hsueh AJ. Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein. *Biol Reprod.* 1995 Jul;53(1):13–20.
199. Danilovich NA, Bartke A, Winters TA. Ovarian follicle apoptosis in bovine growth hormone transgenic mice. *Biol Reprod.* 2000 Jan;62(1):103–7.
200. Lucy MC, Bilby CR, Kirby CJ, Yuan W, Boyd CK. Role of growth hormone in development and maintenance of follicles and corpora lutea. *J Reprod Fertil Suppl.* 1999;54:49–59.
201. Ptak A, Kajta M, Gregoraszczyk EL. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured luteal cells collected from early, mature, and regressing porcine corpora lutea. *Anim Reprod Sci.* 2004 Feb;80(3–4):267–79.
202. Kölle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine in vitro maturation cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod.* 2003 May;68(5):1584–9.
203. Slot KA, Kastelijn J, Bachelot A, Kelly PA, Binart N, Teerds KJ. Reduced recruitment and survival of primordial and growing follicles in GH receptor-deficient mice. *Reprod Camb Engl.* 2006 Mar;131(3):525–32.
204. Bachelot A, Monget P, Imbert-Bolloré P, Coshigano K, Kopchick JJ, Kelly PA, et al. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. *Endocrinology.* 2002 Oct;143(10):4104–12.
205. Zaczek D, Hammond J, Suen L, Wandji S, Service D, Bartke A, et al. Impact of growth hormone resistance on female reproductive function: new insights from growth hormone receptor knockout mice. *Biol Reprod.* 2002 Oct;67(4):1115–24.
206. Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, Arfuso F, Dharmarajan A. Growth hormone during in vitro fertilization in older women modulates the density of receptors in granulosa cells, with improved pregnancy outcomes. *Fertil Steril.* 2018 Jan;110(7):1298–310.
207. Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, Arfuso F, Dharmarajan A. Growth hormone during in vitro fertilization in older women modulates the density of receptors in granulosa cells, with improved pregnancy outcomes. *Fertil Steril.* 2018;110(7):1298–310.
208. Hutchinson LA, Findlay JK, Herington AC. Growth hormone and insulin-like growth factor-I accelerate PMSG-induced differentiation of granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1988 Jan;55(1):61–9.
209. Nakamura E, Otsuka F, Inagaki K, Miyoshi T, Matsumoto Y, Ogura K, et al. Mutual regulation of growth hormone and bone morphogenetic protein system in steroidogenesis by rat granulosa cells. *Endocrinology.* 2012 Jan;153(1):469–80.
210. Langhout DJ, Spicer LJ, Geisert RD. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. *J Anim Sci.* 1991 Aug;69(8):3321–34.
211. Gregoraszczyk EL, Bylica A, Gertler A. Response of porcine theca and granulosa cells to GH during short-term in vitro culture. *Anim Reprod Sci.* 2000 Feb 28;58(1–2):113–25.
212. Jia XC, Kalmijn J, Hsueh AJ. Growth hormone enhances follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 1986 Apr;118(4):1401–9.
213. Apa R, Caruso A, Andreani CL, Miceli F, Lazzarin N, Mastrandrea M, et al. Growth hormone stimulates androsterone synthesis by rat theca-interstitial cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1996 Apr 19;118(1–2):95–101.
214. Juengel JL, Meberg BM, Turzillo AM, Nett TM, Niswender GD. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. *Endocrinology.* 1995 Dec;136(12):5423–9.
215. Nyholt de Prada JK, Kellam LD, Patel BG, Latham KE, Vandevoort CA. Growth hormone and gene expression of in vitro-matured rhesus macaque oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2010 Apr;77(4):353–62.
216. Mason HD, Martikainen H, Beard RW, Anyaoku V, Franks S. Direct gonadotrophic effect of growth hormone on oestradiol production by human granulosa cells in vitro. *J Endocrinol.* 1990 Sep;126(3):R1–4.
217. Barreca A, Artini PG, Del Monte P, Ponzani P, Pasquini P, Cariola G, et al. In vivo and in vitro effect of growth hormone on estradiol secretion by human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 Jul;77(1):61–7.
218. Doldi N, Bassan M, Bonzi V, Ferrari A. Effects of growth hormone and growth hormone-releasing hormone on steroid synthesis in cultured human luteinizing granulosa cells. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol.* 1996 Apr;10(2):101–8.
219. Taketani T, Yamagata Y, Takasaki A, Matsuoka A, Tamura H, Sugino N. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1 on progesterone production in human luteinized granulosa cells. *Fertil Steril.* 2008 Sep 1;90(3):744–8.
220. Ovesen P, Ingerslev HJ, Orskov H, Ledet T. Effect of growth hormone on steroidogenesis, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 production and DNA synthesis in cultured human luteinized granulosa cells. *J Endocrinol.* 1994 Feb;140(2):313–9.

221. Ramasharma K, Li CH. Human pituitary and placental hormones control human insulin-like growth factor II secretion in human granulosa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(9):2643–7.
222. Lanzone A, Di Simone N, Castellani R, Fulghesu AM, Caruso A, Mancuso S. Human growth hormone enhances progesterone production by human luteal cells in vitro: evidence of a synergistic effect with human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril*. 1992 Jan;57(1):92–6.
223. Foster CM, Hashimoto N, Randolph JF, Beitins IZ. Comparison of growth hormone and insulin-like growth factor-I regulation of estradiol and progesterone production in human luteinized granulosa cells. *Pediatr Res*. 1995 Nov;38(5):763–7.
224. Tapanainen J, Martikainen H, Voutilainen R, Orava M, Ruokonen A, Rönnerberg L. Effect of growth hormone administration on human ovarian function and steroidogenic gene expression in granulosa-luteal cells. *Fertil Steril*. 1992 Oct;58(4):726–32.
225. Chen Y, Liu F, Nong Y, Ruan J, Guo Q, Luo M, et al. Clinical efficacy and mechanism of growth hormone action in patients experiencing repeat implantation failure. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018 Sep;96(9):929–32.
226. Davis SR, Smith JF, Gluckman PD. Effects of growth hormone injections on ovulation rate in ewes. *Reprod Fertil Dev*. 1990;2(2):173–8.
227. Yoshimura Y, Iwashita M, Karube M, Oda T, Akiba M, Shiokawa S, et al. Growth hormone stimulates follicular development by stimulating ovarian production of insulin-like growth factor-I. *Endocrinology*. 1994 Sep;135(3):887–94.
228. Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev*. 1996 Nov;45(3):372–7.
229. Pereira GR, Lorenzo PL, Carneiro GF, Ball BA, Gonçalves PBD, Pegoraro LMC, et al. The effect of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on in vitro maturation of equine oocytes. *Zygote Camb Engl*. 2012 Nov;20(4):353–60.
230. de Prada JKN, VandeVoort CA. Growth hormone and in vitro maturation of rhesus macaque oocytes and subsequent embryo development. *J Assist Reprod Genet*. 2008 Apr;25(4):145–58.
231. Apa R, Lanzone A, Miceli F, Mastrandrea M, Caruso A, Mancuso S, et al. Growth hormone induces in vitro maturation of follicle- and cumulus-enclosed rat oocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 1994 Dec;106(1–2):207–12.
232. Srsen V, Kalous J, Nagyova E, Sutovský P, King WA, Motlik J. Effects of follicle-stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes in vitro. *Zygote Camb Engl*. 1998 Nov;6(4):299–309.
233. Izadyar F, Hage WJ, Colenbrander B, Bevers MM. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Mol Reprod Dev*. 1998 Apr;49(4):444–53.
234. Pereira GR, Lorenzo PL, Carneiro GF, Ball BA, Bilodeau-Goeseels S, Kastelic J, et al. The involvement of growth hormone in equine oocyte maturation, receptor localization and steroid production by cumulus-oocyte complexes in vitro. *Res Vet Sci*. 2013 Oct;95(2):667–74.
235. Izadyar F, Zeinstra E, Bevers MM. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*. 1998 Nov;51(3):339–45.
236. Mtango NR, Varisanga MD, Dong YJ, Rajamahendran R, Suzuki T. Growth factors and growth hormone enhance in vitro embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. *Theriogenology*. 2003 Mar;59(5–6):1393–402.
237. Magalhães DM, Duarte ABG, Araújo VR, Brito IR, Soares TG, Lima IMT, et al. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*. 2011 Jan 1;75(1):182–8.
238. Arunakumari G, Shanmugasundaram N, Rao VH. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*. 2010 Sep 15;74(5):884–94.
239. Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, Ahmadi E, Heidari B. Effects of growth hormone on nuclear maturation of ovine oocytes and subsequent embryo development. *Reprod Domest Anim Zuchthyg*. 2010 Jun;45(3):530–6.
240. Izadyar F, Van Tol HT, Colenbrander B, Bevers MM. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Mol Reprod Dev*. 1997 Jun;47(2):175–80.
241. Kiapekou E, Loutradis D, Drakakis P, Zapanti E, Mastorakos G, Antsaklis A. Effects of GH and IGF-I on the in vitro maturation of mouse oocytes. *Horm Athens Greece*. 2005 Sep;4(3):155–60.
242. Menezes YJR, Nicolle B, Rollet J, Hazout A. Pregnancy and delivery after in vitro maturation of naked ICSI-GV oocytes with GH and transfer of a frozen thawed blastocyst: case report. *J Assist Reprod Genet*. 2006 Jan;23(1):47–9.
243. Dor J, Ben-Shlomo I, Lunenfeld B, Pariente C, Levran D, Karasik A, et al. Insulin-like growth factor-I

- (IGF-I) may not be essential for ovarian follicular development: evidence from IGF-I deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 Mar;74(3):539–42.
244. Moreira F, Paula-Lopes FF, Hansen PJ, Badinga L, Thatcher WW. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology.* 2002 Jan 15;57(2):895–907.
245. Pozzobon SE, Lagares MA, Brum DS, Leivas FG, Rubin MIB. Addition of recombinant human growth hormone to in vitro maturation medium of bovine oocytes. *Reprod Domest Anim Zuchthyg.* 2005 Feb;40(1):19–22.
246. Izadyar F, Van Tol HT, Hage WG, Bevers MM. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during in vitro development. *Mol Reprod Dev.* 2000 Nov;57(3):247–55.
247. Markham KE, Kaye PL. Growth hormone, insulin-like growth factor I and cell proliferation in the mouse blastocyst. *Reprod Camb Engl.* 2003 Mar;125(3):327–36.
248. Pers-Kamczyc E, Warzych E, Peippo J, Lechniak D. Growth hormone exerts no effect on the timing of the first zygotic cleavage in cattle. *Theriogenology.* 2010 Sep 1;74(4):581–95.
249. Fukaya T, Yamanaka T, Terada Y, Murakami T, Yajima A. Growth hormone improves mouse embryo development in vitro, and the effect is neutralized by growth hormone receptor antibody. *Tohoku J Exp Med.* 1998 Feb;184(2):113–22.
250. Kölle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F. Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev.* 2002 Feb;61(2):180–6.
251. Drakakis P, Loutradis D, Milingos S, Michalas S, Kallianidis K, Bletsas R, et al. A preliminary study of the effect of growth hormone on mouse preimplantation embryo development in vitro. *Gynecol Obstet Invest.* 1995;40(4):222–6.
252. Yigiter M, Halici Z, Odabasoglu F, Keles ON, Atalay F, Unal B, et al. Growth hormone reduces tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: biochemical and histopathologic evaluation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011 Jul;157(1):94–100.
253. Gong Y, Luo S, Fan P, Jin S, Zhu H, Deng T, et al. Growth hormone alleviates oxidative stress and improves oocyte quality in Chinese women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial. *Sci Rep [Internet].* 2020 Oct 30 [cited 2021 Mar 15];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7599233/>
254. Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci.* 2004 Jul;82–83:109–26.
255. Armstrong DG, Baxter G, Hogg CO, Woad KJ. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reprod Camb Engl.* 2002 Jun;123(6):789–97.
256. Kezele PR, Nilsson EE, Skinner MK. Insulin but not insulin-like growth factor-I promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Jun 28;192(1–2):37–43.
257. Monniaux D, Pisselet C. Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone in vitro. *Biol Reprod.* 1992 Jan;46(1):109–19.
258. Zhao J, Taverne MA, Van Der Weijden GC, Bevers MM, Van Den Hurk R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. *Mol Reprod Dev.* 2001 Mar;58(3):287–96.
259. Zhou H, Zhang Y. Effect of growth factors on in vitro development of caprine preantral follicle oocytes. *Anim Reprod Sci.* 2005 Dec;90(3–4):265–72.
260. Mao J, Smith MF, Rucker EB, Wu GM, McCauley TC, Cantley TC, et al. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. *J Anim Sci.* 2004 Jul;82(7):1967–75.
261. Yoshimura Y, Ando M, Nagamatsu S, Iwashita M, Adachi T, Sueoka K, et al. Effects of insulin-like growth factor-I on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator activity in the rabbit. *Biol Reprod.* 1996 Jul;55(1):152–60.
262. Walters KA, Binnie JP, Campbell BK, Armstrong DG, Telfer EE. The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. *Reprod Camb Engl.* 2006 Mar;131(3):515–23.
263. Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *J Anim Sci.* 1995 Dec;73(12):3719–31.
264. Glister C, Tannetta DS, Groome NP, Knight PG. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol Reprod.* 2001 Oct;65(4):1020–8.
265. Guthrie HD, Garrett WM, Cooper BS. Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells. *Biol Reprod.* 1998 Feb;58(2):390–6.
266. Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiriri A, Hsueh AJ. Gonadotropin suppression of apoptosis in

- cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology*. 1994 Nov 1;135(5):1845–53.
267. Thomas FH, Campbell BK, Armstrong DG, Telfer EE. Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development in vitro. *Reprod Camb Engl*. 2007 Jun;133(6):1121–8.
268. Demeestere I, Gervy C, Centner J, Devreker F, Englert Y, Delbaere A. Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. *Biol Reprod*. 2004 Jun;70(6):1664–9.
269. Magoffin DA, Weitsman SR. Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod*. 1994 Oct;51(4):766–75.
270. Tsuchiya M, Minegishi T, Kishi H, Tano M, Kameda T, Hirakawa T, et al. Control of the expression of luteinizing hormone receptor by local factors in rat granulosa cells. *Arch Biochem Biophys*. 1999 Jul 15;367(2):185–92.
271. Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME, Van Wyk JJ. Somatomedin-C enhances induction of luteinizing hormone receptors by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 1985 Jun;116(6):2369–75.
272. Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen JM, Mazerbourg S, et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*. 2002 Jul;23(1–2):139–54.
273. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Intrafollicular effect of IGF1 on development of follicle dominance in mares. *Anim Reprod Sci*. 2008 May;105(3–4):417–23.
274. Zhao J, Taverne M a. M, van der Weijden GC, Bevers MM, van den Hurk R. Immunohistochemical localisation of growth hormone (GH), GH receptor (GHR), insulin-like growth factor I (IGF-I) and type I IGF-I receptor, and gene expression of GH and GHR in rat pre-antral follicles. *Zygote Camb Engl*. 2002 Feb;10(1):85–94.
275. Silva JRV, Figueiredo JR, van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*. 2009 May;71(8):1193–208.
276. Spicer LJ, Aad PY. Insulin-like growth factor (IGF) 2 stimulates steroidogenesis and mitosis of bovine granulosa cells through the IGF1 receptor: role of follicle-stimulating hormone and IGF2 receptor. *Biol Reprod*. 2007 Jul;77(1):18–27.
277. Xu YP, Chedrese J, Thacker PA. Effects of GH on IGF-II-induced progesterone accumulation by cultured porcine granulosa cells. *Endocrine*. 1997 Oct;7(2):157–63.
278. Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, Bondy C. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 1997 Dec;11(13):1924–33.
279. Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellvé AR, et al. Effects of an *Igf1* gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 1996 Jul;10(7):903–18.
280. Louhio H, Hovatta O, Sjöberg J, Tuuri T. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Mol Hum Reprod*. 2000 Aug;6(8):694–8.
281. Angervo M, Koistinen R, Suikkari AM, Seppälä M. Insulin-like growth factor binding protein-1 inhibits the DNA amplification induced by insulin-like growth factor I in human granulosa-luteal cells. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1991 Jul;6(6):770–3.
282. Olsson JH, Carlsson B, Hillensjö T. Effect of insulin-like growth factor I on deoxyribonucleic acid synthesis in cultured human granulosa cells. *Fertil Steril*. 1990 Dec;54(6):1052–7.
283. Stanek MB, Borman SM, Molskness TA, Larson JM, Stouffer RL, Patton PE. Insulin and insulin-like growth factor stimulation of vascular endothelial growth factor production by luteinized granulosa cells: comparison between polycystic ovarian syndrome (PCOS) and non-PCOS women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jul;92(7):2726–33.
284. Willis DS, Mason HD, Watson H, Franks S. Developmentally regulated responses of human granulosa cells to insulin-like growth factors (IGFs): IGF-I and IGF-II action mediated via the type-I IGF receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Apr;83(4):1256–9.
285. Gong JG, McBride D, Bramley TA, Webb R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. *J Endocrinol*. 1994 Oct;143(1):157–64.
286. Veldhuis JD, Demers LM. A role for somatomedin C as a differentiating hormone and amplifier of hormone action on ovarian cells: studies with synthetically pure human somatomedin C and swine granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985 Jul 16;130(1):234–40.
287. Hernandez ER, Resnick CE, Svoboda ME, Van Wyk JJ, Payne DW, Adashi EY. Somatomedin-C/insulin-like growth factor I as an enhancer of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells. *Endocrinology*. 1988 Apr;122(4):1603–12.
288. Adashi EY, Resnick CE, Brodie AM, Svoboda ME, Van Wyk JJ. Somatomedin-C-mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 1985 Dec;117(6):2313–20.

289. Spicer LJ, Chamberlain CS, Maciel SM. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol*. 2002 Jun;22(4):237–54.
290. Maruo T, Hayashi M, Matsuo H, Ueda Y, Morikawa H, Mochizuki M. Comparison of the facilitative roles of insulin and insulin-like growth factor I in the functional differentiation of granulosa cells: in vitro studies with the porcine model. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1988 Feb;117(2):230–40.
291. Barbieri RL, Makris A, Randall RW, Daniels G, Kistner RW, Ryan KJ. Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986 May;62(5):904–10.
292. Steinkampf MP, Mendelson CR, Simpson ER. Effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P-450 of human ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1988 Sep;59(1–2):93–9.
293. Erickson GF, Garzo VG, Magoffin DA. Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989 Oct;69(4):716–24.
294. Erickson GF, Magoffin DA, Cragun JR, Chang RJ. The effects of insulin and insulin-like growth factors-I and -II on estradiol production by granulosa cells of polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990 Apr;70(4):894–902.
295. Bergh C, Olsson JH, Hillensjö T. Effect of insulin-like growth factor I on steroidogenesis in cultured human granulosa cells. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1991 Aug;125(2):177–85.
296. Mason HD, Margara R, Winston RM, Seppala M, Koistinen R, Franks S. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) inhibits production of IGF-binding protein-1 while stimulating estradiol secretion in granulosa cells from normal and polycystic human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 May;76(5):1275–9.
297. Barreca A, Artini PG, Cesarone A, Arvigo M, D'Ambrogio G, Genazzani AR, et al. Interrelationships between follicle stimulating hormone and the growth hormone--insulin-like growth factor--IGF-binding proteins axes in human granulosa cells in culture. *J Endocrinol Invest*. 1996 Jan;19(1):35–42.
298. Poretsky L, Chandrasekher YA, Bai C, Liu HC, Rosenwaks Z, Giudice L. Insulin receptor mediates inhibitory effect of insulin, but not of insulin-like growth factor (IGF)-I, on IGF binding protein 1 (IGFBP-1) production in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Feb;81(2):493–6.
299. Apa R, Di Simone N, Ronsisvalle E, Miceli F, de Feo D, Caruso A, et al. Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II stimulate progesterone production by human luteal cells: role of IGF-I as mediator of growth hormone action. *Fertil Steril*. 1996 Aug;66(2):235–9.
300. Stocco C, Baumgarten SC, Armouti M, Fierro MA, Winston NJ, Scoccia B, et al. Genome-wide interactions between FSH and insulin-like growth factors in the regulation of human granulosa cell differentiation. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2017 01;32(4):905–14.
301. Yuan W, Giudice LC. Insulin-like growth factor-II mediates the steroidogenic and growth promoting actions of follicle stimulating hormone on human ovarian pre-antral follicles cultured in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Apr;84(4):1479–82.
302. Devoto L, Christenson LK, McAllister JM, Makrigiannakis A, Strauss JF. Insulin and insulin-like growth factor-I and -II modulate human granulosa-lutein cell steroidogenesis: enhancement of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression. *Mol Hum Reprod*. 1999 Nov;5(11):1003–10.
303. Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME, Van Wyk JJ. Follicle-stimulating hormone enhances somatomedin C binding to cultured rat granulosa cells. Evidence for cAMP dependence. *J Biol Chem*. 1986 Mar 25;261(9):3923–6.
304. Hsu CJ, Hammond JM. Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology*. 1987 Jan;120(1):198–207.
305. Vendola K, Zhou J, Wang J, Famuyiwa OA, Bievre M, Bondy CA. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biol Reprod*. 1999 Aug;61(2):353–7.
306. Voutilainen R, Miller WL. Coordinate tropic hormone regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and the cholesterol side-chain-cleavage enzyme, P450scc, in human steroidogenic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Mar;84(6):1590–4.
307. Gómez E, Tarín JJ, Pellicer A. Oocyte maturation in humans: the role of gonadotropins and growth factors. *Fertil Steril*. 1993 Jul;60(1):40–6.
308. Yu Y, Yan J, Li M, Yan L, Zhao Y, Lian Y, et al. Effects of combined epidermal growth factor, brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 on human oocyte maturation and early fertilized and cloned embryo development. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2012 Jul;27(7):2146–59.
309. Xia P, Tekpetey FR, Armstrong DT. Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development in vitro, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. *Mol Reprod Dev*. 1994 Aug;38(4):373–9.
310. Pawshe CH, Rao KB, Totey SM. Effect of insulin-like growth factor I and its interaction with gonadotropins on in vitro maturation and embryonic development, cell proliferation, and biosynthetic activity of cumulus-oocyte complexes and granulosa cells in buffalo. *Mol Reprod Dev*. 1998 Mar;49(3):277–85.

311. Putowski L, Rohan RM, Choi DS, Scherzer WJ, Ricciarelli E, Mordacq J, et al. Rat ovarian insulin-like growth factor binding protein-4: a hormone-dependent granulosa cell-derived antigonadotropin. *J Soc Gynecol Investig.* 1997 Jun;4(3):144–51.
312. Monget P, Monniaux D, Pisselet C, Durand P. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology.* 1993 Apr;132(4):1438–46.
313. Besnard N, Pisselet C, Monniaux D, Locatelli A, Benne F, Gasser F, et al. Expression of messenger ribonucleic acids of insulin-like growth factor binding protein-2, -4, and -5 in the ovine ovary: localization and changes during growth and atresia of antral follicles. *Biol Reprod.* 1996 Dec;55(6):1356–67.
314. Bridges TS, Davidson TR, Chamberlain CS, Geisert RD, Spicer LJ. Changes in follicular fluid steroids, insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding protein concentration, and proteolytic activity during equine follicular development. *J Anim Sci.* 2002 Jan;80(1):179–90.
315. Besnard N, Pisselet C, Monniaux D, Monget P. Proteolytic activity degrading insulin-like growth factor-binding protein-2, -3, -4, and -5 in healthy growing and atretic follicles in the pig ovary. *Biol Reprod.* 1997 Apr;56(4):1050–8.
316. Spicer LJ, Chamberlain CS, Morgan GL. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins during preovulatory follicular development in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 2001 Jul;21(1):1–15.
317. Armstrong DG, Baxter G, Gutierrez CG, Hogg CO, Glazyrin AL, Campbell BK, et al. Insulin-like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology.* 1998 Apr;139(4):2146–54.
318. Liu XJ, Malkowski M, Guo Y, Erickson GF, Shimasaki S, Ling N. Development of specific antibodies to rat insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP-2 to -6): analysis of IGFBP production by rat granulosa cells. *Endocrinology.* 1993 Mar;132(3):1176–83.
319. Suikkari AM, Jalkanen J, Koistinen R, Bützow R, Ritvos O, Ranta T, et al. Human granulosa cells synthesize low molecular weight insulin-like growth factor-binding protein. *Endocrinology.* 1989 Feb;124(2):1088–90.
320. Cataldo NA, Woodruff TK, Giudice LC. Regulation of insulin-like growth factor binding protein production by human luteinizing granulosa cells cultured in defined medium. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 Jan;76(1):207–15.
321. Giudice LC, Milki AA, Milkowski DA, el Danasouri I. Human granulosa contain messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and secrete IGFBPs in culture. *Fertil Steril.* 1991 Sep;56(3):475–80.
322. Mason HD, Willis D, Holly JM, Cwyfan-Hughes SC, Seppala M, Franks S. Inhibitory effects of insulin-like growth factor-binding proteins on steroidogenesis by human granulosa cells in culture. *Mol Cell Endocrinol.* 1992 Nov;89(1–2):R1–4.
323. Halloran BP, DeLuca HF. Effect of vitamin D deficiency on fertility and reproductive capacity in the female rat. *J Nutr.* 1980 Aug;110(8):1573–80.
324. Nicholas C, Davis J, Fisher T, Segal T, Petti M, Sun Y, et al. Maternal Vitamin D Deficiency Programs Reproductive Dysfunction in Female Mice Offspring Through Adverse Effects on the Neuroendocrine Axis. *Endocrinology.* 2016 Apr;157(4):1535–45.
325. Kwiecinski GG, Petrie GI, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 restores fertility of vitamin D-deficient female rats. *Am J Physiol.* 1989 Apr;256(4 Pt 1):E483–487.
326. Johnson LE, DeLuca HF. Reproductive defects are corrected in vitamin d-deficient female rats fed a high calcium, phosphorus and lactose diet. *J Nutr.* 2002 Aug;132(8):2270–3.
327. Johnson LE, DeLuca HF. Vitamin D receptor null mutant mice fed high levels of calcium are fertile. *J Nutr.* 2001 Jun;131(6):1787–91.
328. Wojtusik J, Johnson PA. Vitamin D regulates anti-Mullerian hormone expression in granulosa cells of the hen. *Biol Reprod.* 2012 Mar;86(3):91.
329. Yao X, Zhang G, Guo Y, Ei-Samahy M, Wang S, Wan Y, et al. Vitamin D receptor expression and potential role of vitamin D on cell proliferation and steroidogenesis in goat ovarian granulosa cells. *Theriogenology.* 2017 Oct 15;102:162–73.
330. Kinuta K, Tanaka H, Moriwake T, Aya K, Kato S, Seino Y. Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology.* 2000 Apr;141(4):1317–24.
331. Shapiro AJ, Darmon SK, Barad DH, Gleicher N, Kushnir VA. Vitamin D levels are not associated with ovarian reserve in a group of infertile women with a high prevalence of diminished ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2018 Sep;110(4):761–766.e1.
332. Chang EM, Kim YS, Won HJ, Yoon TK, Lee WS. Association between sex steroids, ovarian reserve, and vitamin D levels in healthy nonobese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Jul;99(7):2526–32.
333. Drakopoulos P, van de Vijver A, Schutyser V, Milatovic S, Anckaert E, Schiettecatte J, et al. The effect of serum vitamin D levels on ovarian reserve markers: a prospective cross-sectional study. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2017 Jan;32(1):208–14.
334. Kim S, Kim JJ, Kim M-J, Han KH, Lee JR, Suh CS, et al. Relationship between serum anti-Mullerian

- hormone with vitamin D and metabolic syndrome risk factors in late reproductive-age women. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2018 Apr;34(4):327–31.
335. Pearce K, Gleeson K, Tremellen K. Serum anti-Müllerian hormone production is not correlated with seasonal fluctuations of vitamin D status in ovulatory or PCOS women. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2015 Sep;30(9):2171–7.
336. Dennis NA, Houghton LA, Jones GT, van Rij AM, Morgan K, McLennan IS. The level of serum anti-Müllerian hormone correlates with vitamin D status in men and women but not in boys. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jul;97(7):2450–5.
337. Merhi ZO, Seifer DB, Weedon J, Adeyemi O, Holman S, Anastos K, et al. Circulating vitamin D correlates with serum antimüllerian hormone levels in late-reproductive-aged women: Women’s Interagency HIV Study. *Fertil Steril*. 2012 Jul;98(1):228–34.
338. Arefi S, Khalili G, Iranmanesh H, Farifteh F, Hosseini A, Fatemi HM, et al. Is the ovarian reserve influenced by vitamin D deficiency and the dress code in an infertile Iranian population? *J Ovarian Res*. 2018 Jul 24;11(1):62.
339. Jukic AMZ, Steiner AZ, Baird DD. Association between serum 25-hydroxyvitamin D and ovarian reserve in premenopausal women. *Menopause N Y N*. 2015 Mar;22(3):312–6.
340. Irani M, Minkoff H, Seifer DB, Merhi Z. Vitamin D increases serum levels of the soluble receptor for advanced glycation end products in women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 May;99(5):E886-890.
341. Dennis NA, Houghton LA, Pankhurst MW, Harper MJ, McLennan IS. Acute Supplementation with High Dose Vitamin D3 Increases Serum Anti-Müllerian Hormone in Young Women. *Nutrients*. 2017 Jul 8;9(7).
342. Naderi Z, Kashanian M, Chenari L, Sheikhsari N. Evaluating the effects of administration of 25-hydroxyvitamin D supplement on serum anti-müllerian hormone (AMH) levels in infertile women. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2018 May;34(5):409–12.
343. Smolikova K, Mlynarcikova A, Scsukova S. Effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 on progesterone secretion by porcine ovarian granulosa cells. *Endocr Regul*. 2013 Jul;47(3):123–31.
344. Grzesiak M, Knapczyk-Stwora K, Slomczynska M. Vitamin D3 in ovarian antral follicles of mature gilts: Expression of its receptors and metabolic enzymes, concentration in follicular fluid and effect on steroid secretion in vitro. *Theriogenology*. 2021 Jan 15;160:151–60.
345. Hong S-H, Lee J-E, An S-M, Shin YY, Hwang DY, Yang SY, et al. Effect of Vitamin D3 on Biosynthesis of Estrogen in Porcine Granulosa Cells via Modulation of Steroidogenic Enzymes. *Toxicol Res*. 2017 Jan;33(1):49–54.
346. Hong S-H, Lee J-E, Kim HS, Jung Y-J, Hwang D, Lee JH, et al. Effect of vitamin D3 on production of progesterone in porcine granulosa cells by regulation of steroidogenic enzymes. *J Biomed Res*. 2016 May;30(3):203–8.
347. Bakhshalizadeh S, Amidi F, Shirazi R, Shabani Nashtaei M. Vitamin D3 regulates steroidogenesis in granulosa cells through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in a mouse model of polycystic ovary syndrome. *Cell Biochem Funct*. 2018 Jun;36(4):183–93.
348. Bakhshalizadeh S, Amidi F, Alleyassin A, Soleimani M, Shirazi R, Shabani Nashtaei M. Modulation of steroidogenesis by vitamin D3 in granulosa cells of the mouse model of polycystic ovarian syndrome. *Syst Biol Reprod Med*. 2017 Jun;63(3):150–61.
349. Michalakakis KG, Mesen TB, Brayboy LM, Yu B, Richter KS, Levy M, et al. Subclinical elevations of thyroid-stimulating hormone and assisted reproductive technology outcomes. *Fertil Steril*. 2011 Jun 30;95(8):2634–7.
350. Zhao T, Chen BM, Zhao XM, Shan ZY. Meta-analysis of ART outcomes in women with different preconception TSH levels. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2018 Nov 5;16(1):111.
351. Jin L, Wang M, Yue J, Zhu G-J, Zhang B. Association between TSH Level and Pregnancy Outcomes in Euthyroid Women Undergoing IVF/ICSI: A Retrospective Study and Meta-analysis. *Curr Med Sci*. 2019 Aug;39(4):631–7.
352. So S, Yamaguchi W, Murabayashi N, Miyano N, Tawara F. Effect of moderately increased thyroid-stimulating hormone levels and presence of thyroid antibodies on pregnancy among infertile women. *Reprod Med Biol*. 2020 Jan;19(1):82–8.
353. Karmon AE, Cardozo ER, Souter I, Gold J, Petrozza JC, Styer AK. Donor TSH level is associated with clinical pregnancy among oocyte donation cycles. *J Assist Reprod Genet*. 2016 Apr;33(4):489–94.
354. Sordia-Hernandez LH, Morales Martinez A, Gris JM, Herrero J, Hernandez Uzcanga C, Merino M, et al. Normal “high” thyroid stimulating hormone (TSH) levels and pregnancy rates in patients undergoing IVF with donor eggs. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2014;41(5):517–20.
355. Gao H, Lu X, Huang H, Ji H, Zhang L, Su Z. TSH level is negatively associated with fertilization rate in patients with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro fertilization. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet*. 2021 Jan 7;
356. Grassi G, Balsamo A, Ansaldi C, Balbo A, Massobrio M, Benedetto C. Thyroid autoimmunity and infertility. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2001 Oct;15(5):389–96.
357. Arojoki M, Jokimaa V, Juuti A, Koskinen P, Irjala K, Anttila L. Hypothyroidism among infertile

- women in Finland. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2000 Apr;14(2):127–31.
358. Bohnet HG, Fiedler K, Leidenberger FA. Subclinical hypothyroidism and infertility. *Lancet Lond Engl*. 1981 Dec 5;2(8258):1278.
359. Busnelli A, Somigliana E, Benaglia L, Leonardi M, Ragni G, Fedele L. In vitro fertilization outcomes in treated hypothyroidism. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc*. 2013 Oct;23(10):1319–25.
360. Scoccia B, Demir H, Kang Y, Fierro MA, Winston NJ. In vitro fertilization pregnancy rates in levothyroxine-treated women with hypothyroidism compared to women without thyroid dysfunction disorders. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc*. 2012 Jun;22(6):631–6.
361. Chai J, Yeung W-YT, Lee C-YV, Li H-WR, Ho P-C, Ng H-YE. Live birth rates following in vitro fertilization in women with thyroid autoimmunity and/or subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014 Jan;80(1):122–7.
362. Kim C-H, Ahn J-W, Kang SP, Kim S-H, Chae H-D, Kang B-M. Effect of levothyroxine treatment on in vitro fertilization and pregnancy outcome in infertile women with subclinical hypothyroidism undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2011 Apr;95(5):1650–4.
363. Abdel Rahman AH, Aly Abbassy H, Abbassy AAE. Improved in vitro fertilization outcomes after treatment of subclinical hypothyroidism in infertile women. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol*. 2010 Oct;16(5):792–7.
364. Pelliccione F, Lania A, Pizzocaro A, Cafaro L, Negri L, Morengi E, et al. Levothyroxine supplementation on assisted reproduction technology (ART) outcomes in women with subtle hypothyroidism: a retrospective study. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2018 Dec;34(12):1053–8.
365. Cai Y, Zhong L, Guan J, Guo R, Niu B, Ma Y, et al. Outcome of in vitro fertilization in women with subclinical hypothyroidism. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2017 May 25;15(1):39.
366. Velkeniers B, Van Meerhaeghe A, Poppe K, Unuane D, Tournaye H, Haentjens P. Levothyroxine treatment and pregnancy outcome in women with subclinical hypothyroidism undergoing assisted reproduction technologies: systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update*. 2013 Jun;19(3):251–8.
367. Rao M, Zeng Z, Zhao S, Tang L. Effect of levothyroxine supplementation on pregnancy outcomes in women with subclinical hypothyroidism and thyroid autoimmunity undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2018 Sep 24;16(1):92.
368. Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med*. 2000 Feb 28;160(4):526–34.
369. Poppe K, Glinoe D, Van Steirteghem A, Tournaye H, Devroey P, Schiettecatte J, et al. Thyroid dysfunction and autoimmunity in infertile women. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc*. 2002 Nov;12(11):997–1001.
370. Unuane D, Velkeniers B, Anckaert E, Schiettecatte J, Tournaye H, Haentjens P, et al. Thyroglobulin autoantibodies: is there any added value in the detection of thyroid autoimmunity in women consulting for fertility treatment? *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc*. 2013 Aug;23(8):1022–8.
371. van den Boogaard E, Vissenberg R, Land JA, van Wely M, van der Post JAM, Goddijn M, et al. Significance of (sub)clinical thyroid dysfunction and thyroid autoimmunity before conception and in early pregnancy: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2011 Oct;17(5):605–19.
372. Artini PG, Uccelli A, Papini F, Simi G, Di Berardino OM, Ruggiero M, et al. Infertility and pregnancy loss in euthyroid women with thyroid autoimmunity. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2013 Jan;29(1):36–41.
373. Kutteh WH, Yetman DL, Carr AC, Beck LA, Scott RT Jr. Increased prevalence of antithyroid antibodies identified in women with recurrent pregnancy loss but not in women undergoing assisted reproduction. *Fertil Steril*. 1999 May;71(5):843–8.
374. Muller AF, Verhoeff A, Mantel MJ, Berghout A. Thyroid autoimmunity and abortion: a prospective study in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1999 Jan;71(1):30–4.
375. Poppe K, Velkeniers B, Glinoe D. The role of thyroid autoimmunity in fertility and pregnancy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008 Jul;4(7):394–405.
376. Chen C-W, Huang Y-L, Tzeng C-R, Huang R-L, Chen C-H. Idiopathic Low Ovarian Reserve Is Associated with More Frequent Positive Thyroid Peroxidase Antibodies. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc*. 2017 Sep;27(9):1194–200.
377. Abalovich M, Mitelberg L, Allami C, Gutierrez S, Alcaraz G, Otero P, et al. Subclinical hypothyroidism and thyroid autoimmunity in women with infertility. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2007 May;23(5):279–83.
378. Saglam F, Onal ED, Ersoy R, Koca C, Ergin M, Erel O, et al. Anti-Müllerian hormone as a marker of premature ovarian aging in autoimmune thyroid disease. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2015 Feb;31(2):165–8.
379. Bahri S, Tehrani FR, Amouzgar A, Rahmati M, Tohidi M, Vasheghani M, et al. Overtime trend of thyroid hormones and thyroid autoimmunity and ovarian reserve: a longitudinal population study with a 12-year follow up. *BMC Endocr Disord*. 2019 May 7;19(1):47.

380. Grigoryan OR, Krasnovskaya NS, Mikheev RK, Yarovaia IS, Andreeva EN, Dedov II. Relationship of the ovarian reserve with autoimmune thyroid diseases in the reproductive period. *Ter Arkh.* 2019 Oct 15;91(10):14–8.
381. Polyzos NP, Sakkas E, Vaiarelli A, Poppe K, Camus M, Tournaye H. Thyroid autoimmunity, hypothyroidism and ovarian reserve: a cross-sectional study of 5000 women based on age-specific AMH values. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2015 Jul;30(7):1690–6.
382. Özalp Akin E, Aycan Z. Evaluation of the Ovarian Reserve in Adolescents with Hashimoto's Thyroiditis Using Serum Anti-Müllerian Hormone Levels. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2018 Nov 29;10(4):331–5.
383. Lambert M, Hocké C, Jimenez C, Frantz S, Papaxanthos A, Creux H. [Repeated in vitro fertilization failure: Abnormalities identified in the diagnostic assessment]. *Gynecol Obstet Fertil.* 2016 Oct;44(10):565–71.
384. Sakar MN, Unal A, Atay AE, Zebitay AG, Verit FF, Demir S, et al. Is there an effect of thyroid autoimmunity on the outcomes of assisted reproduction? *J Obstet Gynaecol J Inst Obstet Gynaecol.* 2016;36(2):213–7.
385. Litwicka K, Arrivi C, Varricchio MT, Mencacci C, Greco E. In women with thyroid autoimmunity, does low-dose prednisolone administration, compared with no adjuvant therapy, improve in vitro fertilization clinical results? *J Obstet Gynaecol Res.* 2015 May;41(5):722–8.
386. Karacan M, Alwaecely F, Cebi Z, Berberoglugil M, Batukan M, Ulug M, et al. Effect of antithyroid antibodies on ICSI outcome in antiphospholipid antibody-negative euthyroid women. *Reprod Biomed Online.* 2013 Oct;27(4):376–80.
387. Kilic S, Tasdemir N, Yilmaz N, Yuksel B, Gul A, Batioglu S. The effect of anti-thyroid antibodies on endometrial volume, embryo grade and IVF outcome. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol.* 2008 Nov;24(11):649–55.
388. Busnelli A, Paffoni A, Fedele L, Somigliana E. The impact of thyroid autoimmunity on IVF/ICSI outcome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2016;22(6):775–90.
389. Kim CH, Chae HD, Kang BM, Chang YS. The influence of antithyroid antibodies in euthyroid women on in vitro fertilization-embryo transfer outcome. *Am J Reprod Immunol N Y N 1989.* 1998 Jul;40(1):2–8.
390. Revelli A, Casano S, Piane LD, Grassi G, Gennarelli G, Guidetti D, et al. A retrospective study on IVF outcome in euthyroid patients with anti-thyroid antibodies: effects of levothyroxine, acetyl-salicylic acid and prednisolone adjuvant treatments. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 2009;7:137.
391. Wu H, Hong T, Gao H, Wang H. [Effects of thyroid autoimmunity on pregnancy outcomes in euthyroid women receiving in vitro fertilization: a meta-analysis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2015 Dec 8;95(46):3770–4.
392. Toulis KA, Goulis DG, Venetis CA, Kolibianakis EM, Negro R, Tarlatzis BC, et al. Risk of spontaneous miscarriage in euthyroid women with thyroid autoimmunity undergoing IVF: a meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2010 Apr;162(4):643–52.
393. Seungdamrong A, Steiner AZ, Gracia CR, Legro RS, Diamond MP, Coutifaris C, et al. Preconceptional antithyroid peroxidase antibodies, but not thyroid-stimulating hormone, are associated with decreased live birth rates in infertile women. *Fertil Steril.* 2017 Oct 25;
394. Dong AC, Morgan J, Kane M, Stagnaro-Green A, Stephenson MD. Subclinical hypothyroidism and thyroid autoimmunity in recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2020 Mar 1;113(3):587-600.e1.
395. Chen X, Mo M-L, Huang C-Y, Diao L-H, Li G-G, Li Y-Y, et al. Association of serum autoantibodies with pregnancy outcome of patients undergoing first IVF/ICSI treatment: A prospective cohort study. *J Reprod Immunol.* 2017 Aug;122:14–20.
396. Unuane D, Velkeniers B, Deridder S, Bravenboer B, Tournaye H, De Brucker M. Impact of thyroid autoimmunity on cumulative delivery rates in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril.* 2016;106(1):144–50.
397. Wang H, Gao H, Chi H, Zeng L, Xiao W, Wang Y, et al. Effect of Levothyroxine on Miscarriage Among Women With Normal Thyroid Function and Thyroid Autoimmunity Undergoing In Vitro Fertilization and Embryo Transfer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2017 Dec 12;318(22):2190–8.
398. Negro R, Mangieri T, Coppola L, Presicce G, Casavola EC, Gismondi R, et al. Levothyroxine treatment in thyroid peroxidase antibody-positive women undergoing assisted reproduction technologies: a prospective study. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2005 Jun;20(6):1529–33.
399. Zhang SC, Wang SW, Zhao XD, Zhang JR. Obstetrical complications of thyroid peroxidase antibody positive during pregnancy and effects of intervention: a meta-analysis. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2016 Apr 25;51(4):250–7.
400. Thangaratnam S, Tan A, Knox E, Kilby MD, Franklyn J, Coomarasamy A. Association between thyroid autoantibodies and miscarriage and preterm birth: meta-analysis of evidence. *BMJ.* 2011 May 9;342:d2616.
401. Mendoza C, Cremades N, Ruiz-Requena E, Martinez F, Ortega E, Bernabeu S, et al. Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1999 Mar;14(3):628–35.

402. Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, et al. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2002 Apr;17(4):1017–22.
403. Potashnik G, Lunenfeld E, Shwartz I, Glezerman M, Roberts CT, LeRoith D, et al. Endogenous plasma growth hormone and the occurrence of pregnancies in patients undergoing in-vitro fertilization and embryo transfer with ovarian stimulation. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1995 May;10(5):1065–9.
404. Bergh C, Carlström K, Selleskog U, Hillensjö T. Effect of growth hormone on follicular fluid androgen levels in patients treated with gonadotropins before in vitro fertilization. *Eur J Endocrinol*. 1996 Feb;134(2):190–6.
405. Drakopoulos P, Pluchino N, Bischof P, Cantero P, Meyer P, Chardonnens D. Effect of Growth Hormone on Endometrial Thickness and Fertility Outcome in the Treatment of Women with Panhypopituitarism: A Case Report. *J Reprod Med*. 2016 Feb;61(1–2):78–82.
406. Albu D, Albu A. Is growth hormone administration essential for in vitro fertilization treatment of female patients with growth hormone deficiency? *Syst Biol Reprod Med*. 2019 Feb;65(1):71–4.
407. Rajesh H, Yong YY, Zhu M, Chia D, Yu SL. Growth hormone deficiency and supplementation at in-vitro fertilisation. *Singapore Med J*. 2007 Jun;48(6):514–8.
408. Harper K, Proctor M, Hughes E. Growth hormone for in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(3):CD000099.
409. Ahmad G, Brown J, Duffy JM, Nardo LG, Watson A. Growth hormone for in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Oct 7;(4):CD000099.
410. Duffy JM, Ahmad G, Mohiyiddeen L, Nardo LG, Watson A. Growth hormone for in vitro fertilization. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Jan 20;(1):CD000099.
411. Li J, Chen Q, Wang J, Huang G, Ye H. Does growth hormone supplementation improve oocyte competence and IVF outcomes in patients with poor embryonic development? A randomized controlled trial. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2020 May 20;20(1):310.
412. Li X-L, Wang L, Lv F, Huang X-M, Wang L-P, Pan Y, et al. The influence of different growth hormone addition protocols to poor ovarian responders on clinical outcomes in controlled ovary stimulation cycles: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Mar;96(12):e6443.
413. Hart RJ, Rombauts L, Norman RJ. Growth hormone in IVF cycles: any hope? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2017 Jun;29(3):119–25.
414. Hart RJ. Use of Growth Hormone in the IVF Treatment of Women With Poor Ovarian Reserve. *Front Endocrinol [Internet]*. 2019 [cited 2019 Aug 1];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00500/full>
415. Yang P, Wu R, Zhang H. The effect of growth hormone supplementation in poor ovarian responders undergoing IVF or ICSI: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2020 Jul 29;18(1):76.
416. Zhang Y, Zhang C, Shu J, Guo J, Chang H-M, Leung PCK, et al. Adjuvant treatment strategies in ovarian stimulation for poor responders undergoing IVF: a systematic review and network meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2020 Feb 28;26(2):247–63.
417. Yu X, Ruan J, He L-P, Hu W, Xu Q, Tang J, et al. Efficacy of growth hormone supplementation with gonadotrophins in vitro fertilization for poor ovarian responders: an updated meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(4):4954–67.
418. Cozzolino M, Cecchino GN, Troiano G, Romanelli C. Growth hormone cotreatment for poor responders undergoing in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2020 Jul;114(1):97–109.
419. Kolibianakis EM, Venetis CA, Diedrich K, Tarlatzis BC, Griesinger G. Addition of growth hormone to gonadotrophins in ovarian stimulation of poor responders treated by in-vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2009 Dec;15(6):613–22.
420. Kyrou D, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Bontis J, Tarlatzis BC. How to improve the probability of pregnancy in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2009 Mar;91(3):749–66.
421. Norman RJ, Alvino H, Hull LM, Mol BW, Hart RJ, Kelly T-L, et al. Human growth hormone for poor responders: a randomized placebo-controlled trial provides no evidence for improved live birth rate. *Reprod Biomed Online*. 2019 Jun;38(6):908–15.
422. Altmäe S, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C, Mendoza N, Cucinelli F, Tesarik J. Effect of Growth Hormone on Uterine Receptivity in Women With Repeated Implantation Failure in an Oocyte Donation Program: A Randomized Controlled Trial. *J Endocr Soc*. 2018 Jan 1;2(1):96–105.
423. Hazout A, Junca A, De Mouzon J, Cohen-Bacrie P. Effect of growth hormone on oocyte competence in patients with multiple IVF failures. *Reprod Biomed Online*. 2009 Jan 1;18(5):664–70.
424. Hassan HA, Azab H, Rahman AA, Nafee TM. Effects of growth hormone on in vitro maturation of germinal vesicle of human oocytes retrieved from small antral follicles. *J Assist Reprod Genet*. 2001 Aug;18(8):417–20.
425. Li Y, Liu H, Yu Q, Liu H, Huang T, Zhao S, et al. Growth Hormone Promotes in vitro Maturation of

- Human Oocytes. *Front Endocrinol* [Internet]. 2019 [cited 2019 Aug 1];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00485/full>
426. Cui N, Li A-M, Luo Z-Y, Zhao Z-M, Xu Y-M, Zhang J, et al. Effects of growth hormone on pregnancy rates of patients with thin endometrium. *J Endocrinol Invest*. 2019 Jan;42(1):27–35.
 427. Xue-Mei W, Hong J, Wen-Xiang Z, Yang L. The effects of growth hormone on clinical outcomes after frozen-thawed embryo transfer. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet*. 2016 Jun;133(3):347–50.
 428. Keane KN, Ye Y, Hinchliffe PM, Regan SL, Dhaliwal SS, Yovich JL. Live birth outcomes of vitrified embryos generated under growth hormone stimulation are improved for women categorized as poor-prognosis. *Clin Exp Reprod Med*. 2019 Dec;46(4):178–88.
 429. The ESHRE Guideline Group on Ovarian Stimulation, Bosch E, Broer S, Griesinger G, Grynberg M, Humaidan P, et al. ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI†. *Hum Reprod Open*. 2020 Feb 1;2020(2).
 430. Chu J, Gallos I, Tobias A, Tan B, Eapen A, Coomarasamy A. Vitamin D and assisted reproductive treatment outcome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2018 Jan 1;33(1):65–80.
 431. Somigliana E, Paffoni A, Lattuada D, Colciaghi B, Filippi F, La Vecchia I, et al. Serum Levels of 25-Hydroxyvitamin D and Time to Natural Pregnancy. *Gynecol Obstet Invest*. 2016;81(5):468–71.
 432. Fang F, Ni K, Cai Y, Shang J, Zhang X, Xiong C. Effect of vitamin D supplementation on polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Complement Ther Clin Pract*. 2017 Feb;26:53–60.
 433. Akbari M, Ostadmohammadi V, Lankarani KB, Tabrizi R, Kolahdooz F, Heydari ST, et al. The Effects of Vitamin D Supplementation on Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress Among Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab*. 2018 Apr;50(4):271–9.
 434. Irani M, Seifer DB, Grazi RV, Irani S, Rosenwaks Z, Tal R. Vitamin D Decreases Serum VEGF Correlating with Clinical Improvement in Vitamin D-Deficient Women with PCOS: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*. 2017 Mar 28;9(4).
 435. Rashidi B, Haghollahi F, Shariat M, Zayerii F. The effects of calcium-vitamin D and metformin on polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2009 Jun;48(2):142–7.
 436. Tehrani HG, Mostajeran F, Shahsavari S. The effect of calcium and vitamin D supplementation on menstrual cycle, body mass index and hyperandrogenism state of women with poly cystic ovarian syndrome. *J Res Med Sci Off J Isfahan Univ Med Sci*. 2014 Sep;19(9):875–80.
 437. Rudick B, Ingles S, Chung K, Stanczyk F, Paulson R, Bendikson K. Characterizing the influence of vitamin D levels on IVF outcomes. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2012 Nov;27(11):3321–7.
 438. Trably C, Brosse A, Plotton I, Berthillier J, Du Mesnildot P, Hadj S, et al. Predictive value of vitamin D plasma levels on pregnancy rates in a cohort of IVF patients. *Gynecol Obstet Fertil*. 2015 Nov;43(11):722–7.
 439. Rudick BJ, Ingles SA, Chung K, Stanczyk FZ, Paulson RJ, Bendikson KA. Influence of vitamin D levels on in vitro fertilization outcomes in donor-recipient cycles. *Fertil Steril*. 2014 Feb;101(2):447–52.
 440. Paffoni A, Ferrari S, Viganò P, Pagliardini L, Papaleo E, Candiani M, et al. Vitamin D deficiency and infertility: insights from in vitro fertilization cycles. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Nov;99(11):E2372–2376.
 441. Garbedian K, Boggild M, Moody J, Liu KE. Effect of vitamin D status on clinical pregnancy rates following in vitro fertilization. *CMAJ Open*. 2013 May;1(2):E77–82.
 442. Polyzos NP, Anckaert E, Guzman L, Schiettecatte J, Van Landuyt L, Camus M, et al. Vitamin D deficiency and pregnancy rates in women undergoing single embryo, blastocyst stage, transfer (SET) for IVF/ICSI. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2014 Sep;29(9):2032–40.
 443. Zhao J, Liu S, Wang Y, Wang P, Qu D, Liu M, et al. Vitamin D improves in-vitro fertilization outcomes in infertile women with polycystic ovary syndrome and insulin resistance. *Minerva Med*. 2019 Jun;110(3):199–208.
 444. Abadia L, Gaskins AJ, Chiu Y-H, Williams PL, Keller M, Wright DL, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and treatment outcomes of women undergoing assisted reproduction. *Am J Clin Nutr*. 2016 Sep;104(3):729–35.
 445. van de Vijver A, Drakopoulos P, Van Landuyt L, Vaiarelli A, Blockeel C, Santos-Ribeiro S, et al. Vitamin D deficiency and pregnancy rates following frozen-thawed embryo transfer: a prospective cohort study. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2016 Aug;31(8):1749–54.
 446. Vanni VS, Viganò P, Somigliana E, Papaleo E, Paffoni A, Pagliardini L, et al. Vitamin D and assisted reproduction technologies: current concepts. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2014 May 31;12:47.
 447. Zhao J, Huang X, Xu B, Yan Y, Zhang Q, Li Y. Whether vitamin D was associated with clinical outcome after IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2018 Feb 9;16(1):13.
 448. Lv SS, Wang JY, Wang XQ, Wang Y, Xu Y. Serum vitamin D status and in vitro fertilization outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2016 Jun;293(6):1339–45.
 449. Cozzolino M, Busnelli A, Pellegrini L, Riviello E, Vitagliano A. How vitamin D level influences

- in vitro fertilization outcomes: results of a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2020 Nov;114(5):1014–25.
450. Banker M, Sorathiya D, Shah S. Vitamin D Deficiency Does Not Influence Reproductive Outcomes of IVF-ICSI: A Study of Oocyte Donors and Recipients. *J Hum Reprod Sci*. 2017 Jun;10(2):79–85.
451. Fabris A, Pacheco A, Cruz M, Puente JM, Fatemi H, Garcia-Velasco JA. Impact of circulating levels of total and bioavailable serum vitamin D on pregnancy rate in egg donation recipients. *Fertil Steril*. 2014 Dec;102(6):1608–12.
452. Somigliana E, Sarais V, Reschini M, Ferrari S, Makieva S, Chiara Cermisoni G, et al. Single oral dose of vitamin D3 supplementation prior to in vitro fertilization and embryo transfer in normal weight women: the SUNDRO randomized controlled trial. *Am J Obstet Gynecol*. 2021 Apr 21;
453. Bezerra Espinola MS, Bilotta G, Aragona C. Positive effect of a new supplementation of vitamin D3 with myo-inositol, folic acid and melatonin on IVF outcomes: a prospective randomized and controlled pilot study. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2021 Mar;37(3):251–4.
454. Aflatoonian A, Arabjahvani F, Eftekhari M, Sayadi M. Effect of vitamin D insufficiency treatment on fertility outcomes in frozen-thawed embryo transfer cycles: A randomized clinical trial. *Iran J Reprod Med*. 2014 Sep;12(9):595–600.
455. ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. Electronic address: coticchio.biogenesi@grupposandonato.it. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reprod Biomed Online*. 2017 Nov;35(5):494–510.
456. Medistica. pvalue.io, a graphic user interface to the R statistical analysis software for scientific medical publications. Available on: <https://www.pvalue.io>; 2019.
457. Steiner M, Haskett RF, Carroll BJ, Hays SE, Rubin RT. Circadian hormone secretory profiles in women with severe premenstrual tension syndrome. *Br J Obstet Gynaecol*. 1984 May;91(5):466–71.
458. Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 May;83(5):1746–51.
459. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of “poor response” to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2011 Jul;26(7):1616–24.
460. Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Lindeberg M, Landgren B-M, Sparre LS, Hovatta O. Thyroid-stimulating hormone receptor and thyroid hormone receptors are involved in human endometrial physiology. *Fertil Steril*. 2011 Jan;95(1):230–7, 237.e1-2.
461. Ruh MF, Ruh TS, Klitgaard HM. Uptake and retention of estrogens by uteri from rats in various thyroid states. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. 1970 Jun;134(2):558–61.
462. Schultze AB, Noonan J. Thyroxine administration and reproduction in rats. *J Anim Sci*. 1970 May;30(5):774–6.
463. Papotti M, Ghè C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, et al. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Oct;85(10):3803–7.
464. Sharara FI, Nieman LK. Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in leiomyoma and surrounding myometrium. *Am J Obstet Gynecol*. 1995 Sep;173(3 Pt 1):814–9.
465. Sbracia M, Scarpellini F, Poverini R, Alò PL, Rossi G, Di Tondo U. Immunohistochemical localization of the growth hormone in human endometrium and decidua. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989. 2004 Feb;51(2):112–6.
466. Zhou J, Dsupin BA, Giudice LC, Bondy CA. Insulin-like growth factor system gene expression in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Dec;79(6):1723–34.
467. Giudice LC. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil Steril*. 1994 Jan;61(1):1–17.
468. Giudice LC, Dsupin BA, Jin IH, Vu TH, Hoffman AR. Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factors and their receptors in human uterine endometrium and decidua. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 May;76(5):1115–22.
469. Giudice LC, Lamson G, Rosenfeld RG, Irwin JC. Insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF binding proteins in human endometrium. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;626:295–307.
470. Irwin JC, Dsupin BA, Giudice LC. Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-4 in human endometrial stromal cell cultures: evidence for ligand-induced proteolysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Feb;80(2):619–26.
471. Irwin JC, de las Fuentes L, Dsupin BA, Giudice LC. Insulin-like growth factor regulation of human endometrial stromal cell function: coordinate effects on insulin-like growth factor binding protein-1, cell proliferation and prolactin secretion. *Regul Pept*. 1993 Oct 20;48(1–2):165–77.
472. Giudice LC, Milkowski DA, Lamson G, Rosenfeld RG, Irwin JC. Insulin-like growth factor binding proteins in human endometrium: steroid-dependent messenger ribonucleic acid expression and protein synthesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991 Apr;72(4):779–87.

473. Giudice LC, Milkowski DA, Fielder PJ, Irwin JC. Characterization of the steroid-dependence of insulin-like growth factor-binding protein-2 synthesis and mRNA expression in cultured human endometrial stromal cells. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1991 May;6(5):632–40.
474. Kennedy TG, Doktorcik PE. Uterine decidualization in hypophysectomized-ovariectomized rats: effects of pituitary hormones. *Biol Reprod*. 1988 Sep;39(2):318–28.
475. Gunin AG. Influence of growth hormone on the uterine response to oestradiol in rats. *J Reprod Fertil*. 1997 Jul;110(2):299–306.
476. Jenkinson CM, Min SH, Mackenzie DD, McCutcheon SN, Breier BH, Gluckman PD. Placental development and fetal growth in growth hormone-treated ewes. *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc*. 1999 Feb;9(1):11–7.
477. Spencer TE, Gray A, Johnson GA, Taylor KM, Gertler A, Gootwine E, et al. Effects of recombinant ovine interferon tau, placental lactogen, and growth hormone on the ovine uterus. *Biol Reprod*. 1999 Dec;61(6):1409–18.
478. Cohen O, Schindel B, Homburg R. Uterine leiomyomata--a feature of acromegaly. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1998 Jul;13(7):1945–6.
479. Tsilchorozidou T, Conway GS. Uterus size and ovarian morphology in women with isolated growth hormone deficiency, hypogonadotropic hypogonadism and hypopituitarism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004 Nov;61(5):567–72.
480. Oliveira CRP, Salvatori R, Nóbrega LMA, Carvalho EOM, Menezes M, Farias CT, et al. Sizes of abdominal organs in adults with severe short stature due to severe, untreated, congenital GH deficiency caused by a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Jul;69(1):153–8.
481. Ghahary A, Murphy LJ. Uterine insulin-like growth factor-I receptors: regulation by estrogen and variation throughout the estrous cycle. *Endocrinology*. 1989 Aug;125(2):597–604.
482. Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG. Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 1987 Jul;1(7):445–50.
483. Kapur S, Tamada H, Dey SK, Andrews GK. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone. *Biol Reprod*. 1992 Feb;46(2):208–19.
484. Sharara FI, Bhartiya D, Nieman LK. Growth hormone receptor gene expression in the mouse uterus: modulation by gonadal steroids. *J Soc Gynecol Investig*. 1994 Dec;1(4):285–9.
485. Viganò P, Lattuada D, Mangioni S, Ermellino L, Vignali M, Caporizzo E, et al. Cycling and early pregnant endometrium as a site of regulated expression of the vitamin D system. *J Mol Endocrinol*. 2006 Jun;36(3):415–24.
486. Agic A, Xu H, Altgassen C, Noack F, Wolfler MM, Diedrich K, et al. Relative expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor, vitamin D 1 alpha-hydroxylase, vitamin D 24-hydroxylase, and vitamin D 25-hydroxylase in endometriosis and gynecologic cancers. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif*. 2007 Jul;14(5):486–97.
487. Vienonen A, Miettinen S, Bläuer M, Martikainen PM, Tomás E, Heinonen PK, et al. Expression of nuclear receptors and cofactors in human endometrium and myometrium. *J Soc Gynecol Investig*. 2004 Feb;11(2):104–12.
488. Daftary GS, Taylor HS. Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr Rev*. 2006 Jun;27(4):331–55.
489. Evans KN, Nguyen L, Chan J, Innes BA, Bulmer JN, Kilby MD, et al. Effects of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cytokine production by human decidual cells. *Biol Reprod*. 2006 Dec;75(6):816–22.
490. Evans KN, Bulmer JN, Kilby MD, Hewison M. Vitamin D and placental-decidual function. *J Soc Gynecol Investig*. 2004 Jul;11(5):263–71.
491. Chen X, Yin B, Lian R-C, Zhang T, Zhang H-Z, Diao L-H, et al. Modulatory effects of vitamin D on peripheral cellular immunity in patients with recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol N Y N 1989*. 2016 Dec;76(6):432–8.
492. Tavakoli M, Jeddi-Tehrani M, Salek-Moghaddam A, Rajaei S, Mohammadzadeh A, Sheikhhasani S, et al. Effects of 1,25(OH)₂ vitamin D3 on cytokine production by endometrial cells of women with recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril*. 2011 Sep;96(3):751–7.
493. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2011 Jun;26(6):1270–83.
494. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1999 Jun;11(3):307–11.

Annexes

Annexe 1: Synthèse de la détection des acteurs de l'axe somatotrope au niveau ovarien

	GHRH	GHRHR	GH	GHR	IGF1	IGF2	IGF1R	IGF2R	IGFBP1	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP4	IGFBP5	IGFBP6
Liquide folliculaire	NR	NA	+	NA	+	+	NA	NA	+	+	+	+	+	+
Granulosa : <i>Follicule primordial</i>	-	NR	+	-	-	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Granulosa : <i>Follicule préantral</i>	-	+	+	++	-	++	++	+	+	+	+	++	+	++
Granulosa : <i>Follicule préovulatoire</i>	-	+	+	+	+	+++	++	++	++	++	++	+	++	+
Thèque	+	+	NR	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cellules stromales	NR	NR	+	+	NR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ovocytes	NR	+	+	+	-	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Embryons	NR	NR	NR	+	+	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NA : non applicable, NR : non réalisé

Annexe 2: Formulaire de consentement du couple (page 1/2)

CONSENTEMENT DE PARTICIPATION du couple infertile à l'étude **Impact du tabagisme masculin sur l'infertilité du couple : étude cas-témoins bicentrique. (Tabafertimasc)**

PROMOTEUR	INVESTIGATEUR COORDONNATEUR
Madame Catherine GEINDRE Directrice Générale du CHU d'Amiens Par délégation, Monsieur le Docteur Jean-Claude BARBARE Coordonnateur de la Recherche Clinique et de l'Innovation CHU d'Amiens – Site Nord 1 Place Victor PAUCHET 80054 AMIENS Cedex Tél. : 03-22-66-80-60 Fax : 03-22-66-87-52 Email : barbare.jeanclaude@chu-amiens.fr	Madame le Docteur Aviva DEVAUX Laboratoire de Biologie de la Reproduction et de Cytogénétique CHU d'Amiens – Site CGO 123 rue Camille DESMOULINSt 80054 AMIENS Cedex Tél. : 03-22-53-36-75 Fax : 03-22-53-36-79 Email : devaux.aviva@chu-amiens.fr

Mme (Nom, Prénom) _____ née le _____

M r (Nom, Prénom) _____ né le _____

Adresse :

Le Docteur : nous a proposé de participer à une étude organisée par le CHU d'Amiens concernant le rôle du tabac sur la fertilité.

L'étude sera menée conformément au Code de santé publique titre II du premier livre relatif aux recherches biomédicales

Le Comité Consultatif de Protection des Personnes NORD OUEST II a émis un avis favorable à la mise en œuvre de ce protocole le.....

Dans la lettre d'information qui nous a été remise, il nous a été précisé que nous sommes libres d'accepter ou de refuser sans que cela ne conditionne notre prise en charge en AMP ou ne modifie le traitement prévu pour sa mise en œuvre.

Nous avons reçu et nous avons bien compris les informations suivantes :

- Ce travail sera réalisé en collaboration avec des médecins spécialistes de l'exploration de l'infertilité sur 2 CHU Amiens et Caen
- Certains prélèvements seront nécessaires et sont pour certains réalisés dans le cadre de la fécondation in vitro, il s'agit:
 - de la passation d'un questionnaire sur les habitudes de vie et de consommation de tabagisme pour chacun de vous et qui est réalisé lors du bilan d'infertilité
 - d'un ou plusieurs prélèvements cités ci-dessous sont :
 - une prise de sang pour évaluer le taux de cotinine (dérivé de la nicotine) qui pourra être réalisée en même temps que le bilan biologique pré AMP ou lors du cycle d'AMP
 - une mesure du monoxyde de carbone expiré à l'aide d'un testeur pour déterminer le taux de ce composé dans l'air que vous expirez. et qui évalue le tabagisme récent
 - recueil de quelques cheveux (4 à 6) pour évaluer le tabagisme chronique
 - Certains milieux biologiques recueillis lors du bilan d'infertilité ou lors du cycle d'assistance médicale à la procréation au lieu d'être éliminés seront conservés en vue de la réalisation du protocole ou en vue de recherches complémentaires à postériori
 - un recueil de sperme effectué au laboratoire de Biologie de la Reproduction lors du bilan d'infertilité ou le jour de l'AMP, préalable à la réalisation de la FIV, d'un recueil d'urine
 - le recueil du liquide folliculaire lors de la ponction ovarienne

Annexe 3: Formulaire de consentement du couple (page 2/2)

L'ensemble des échantillons prélevés sera conservé en vue de la réalisation du protocole et pourra permettre d'éventuelles recherches complémentaires à posteriori. Ils feront l'objet d'une déclaration de « collection biologique » auprès du ministère de la santé et de la recherche.

Nous confirmons être affilié à un régime de sécurité social ou être bénéficiaire d'un tel régime et nous sommes informés que conformément à la loi du 20 décembre 1988 modifiée relative à la protection des personnes se prêtant à la recherche biomédicale, et du décret d'application N° 91-440 du 14 mai 1991, le CHU d'Amiens, promoteur de l'étude, a souscrit une assurance couvrant les risques directs liés à l'étude dans la stricte application du protocole.

Nom de la compagnie :

Adresse :

Numéro de contrat :

NOUS ACCEPTONS DE PARTICIPER A CETTE RECHERCHE DANS LES CONDITIONS PRECISEES CI-DESSUS.

Notre consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités. Nous conservons tous nos droits garantis par la Loi. Si nous le désirons ou si l'un d'entre nous le désire, nous sommes libres à tout moment de suspendre notre participation. Nous informerons alors le Docteur

Conformément à la loi « informatique et liberté », n° 2004-801 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements des données à caractère personnel et modifiant la loi 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, nous acceptons que les données enregistrées à l'occasion de cette étude puissent faire l'objet d'un traitement informatisé en préservant strictement notre anonymat. Les données qui nous concernent resteront strictement confidentielles et nous n'autorisons leur consultation que par des personnes qui collaborent à cette recherche, aux personnes mandatées par le promoteur et soumis au secret professionnel, et éventuellement à un représentant des autorités de santé ou judiciaire. Notre droit d'accès et de rectification à ces informations pourra s'exercer à tout moment auprès du Docteur Devaux.

Nous sommes informés que nous pourrions demander à tout moment toutes les informations complémentaires au Docteur Devaux en appelant le 0322533675 ou le 0322533677

Fait à le.....

En double exemplaire, dont un remis au couple

Signature de l'investigateur :

Signature précédée de la mention « lu et approuvé » par les 2 membres du couple :

Annexe 4: Lettre d'information (page 1/2)

LETTRE D'INFORMATION DESTINEE AUX COUPLES infertiles devant bénéficier d'une AMP

PROTOCOLE : Impact du tabagisme masculin sur l'infertilité du couple : étude cas-témoins bicentrique (Tabafertimase)

PROMOTEUR	INVESTIGATEUR COORDONNATEUR
<p>Madame Catherine GEINDRE Directrice Générale du CHU d'Amiens Par délégation, Monsieur le Docteur Jean-Claude BARBARE Coordonnateur de la Recherche Clinique et de l'Innovation CHU d'Amiens – Site Nord 1 Place Victor PAUCHET 80054 AMIENS Cedex Tél. : 03-22-66-80-60 Fax : 03-22-66-87-52 Email : barbare.jeanclaude@chu-amiens.fr</p>	<p>Madame le Docteur Aviva DEVAUX Laboratoire de Biologie de la Reproduction et de Cytogénétique CHU d'Amiens – Site CGO 123 rue Camille DESMOULINSt 80054 AMIENS Cedex Tél. : 03-22-53-36-75 Fax : 03-22-53-36-79 Email : devaux.aviva@chu-amiens.fr</p>

Madame, Monsieur,

Vous consultez pour infertilité, le recours à une Assistance Médicale à la Procréation (AMP) vous a été proposé. Parmi les facteurs pouvant intervenir sur la fertilité figure le tabac. Le rôle du tabac est encore mal connu. C'est pourquoi le Docteurvous propose de participer à une étude destinée à évaluer précisément ce rôle. Ce protocole, qui doit inclure 200 couples fertiles et 200 infertiles, a pour but d'améliorer la prise en charge en AMP des couples infertiles. Les résultats des tentatives d'AMP seront analysés en fonction du statut tabagique et comparés aux données recueillies chez 200 couples fertiles. Ses principales caractéristiques et contraintes sont résumées ci-après.

Les objectifs sont l'évaluation de la consommation de tabac et son impact sur la fertilité.

Le nom du PROTOCOLE : Impact du tabagisme masculin sur l'infertilité du couple : étude cas-témoins bicentrique (Tabafertimase)

Il sera mené conformément au Code de santé publique titre II du premier livre relatif aux recherches biomédicales. Le Comité de Protection des personnes NORD OUEST II a autorisé sa mise en œuvre le

Ce travail sera réalisé en collaboration avec des médecins spécialistes de l'exploration de l'infertilité (notamment le Dr A. Devaux coordinateur de l'étude et les Professeurs P. Merviel, les Dr E. Lourdel, Dr R. Cabry et F. Brasseur du CHU d'Amiens ; et les Pr M. Herlicoviez et Dr I. Denis Galleraud du CHRU de Caen).

L'étude comprend :

- La passation d'un questionnaire sur les habitudes de vie et du tabagisme pour chacun de vous
- Un ou plusieurs prélèvements cités ci-dessous sont nécessaires et font déjà parti du bilan pré AMP ou peuvent être réalisés lors du suivi de l'AMP:

- une prise de sang pour évaluer le taux de cotinine (dérivé de la nicotine)
- une mesure du monoxyde de carbone expiré à l'aide d'un testeur pour déterminer le taux de ce composé dans l'air que vous expirez.
- un recueil de sperme effectué au laboratoire de Biologie de la Reproduction ou le jour de l'assistance médicale à la procréation pour analyser la spermatogénèse
- un recueil d'urine
- le recueil de quelques cheveux (4 à 6)
- le recueil des liquides folliculaires et milieux de cultures lors de la tentative d'AMP

L'ensemble des échantillons prélevés sera conservé en vue de la réalisation du protocole et pourront permettre d'éventuels recherches complémentaires à postériori. Ils feront l'objet d'une déclaration de « collection biologique » auprès du ministère de la santé et de la recherche

Annexe 5: Lettre d'information (page 2/2)

Vous devez obligatoirement être affilié à un régime de sécurité social ou être bénéficiaire d'un tel régime.

Les données nominatives de l'AMP informatisées seront traitées de façon habituelle dans le dossier médical conformément aux dispositions de la loi n° 2004-801 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements des données à caractère personnel et modifiant la loi 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés. L'ensemble des données recueillies et analysées pour l'étude seront traitées de façon anonymisée. Vous êtes informés que vous pouvez à tout moment exercer votre droit d'accès et de rectification garanti par les articles 39 et 40 de ladite loi en vous adressant au coordinateur de l'étude au CHU d'Amiens (Téléphone : 0322533675 ou 77)

Votre adhésion à ce protocole ne conditionne en aucune façon votre prise en charge en AMP et ne modifiera en aucune manière le traitement de stimulation ovarienne ou la technique d'AMP choisie et adaptée à votre cas. Vous pouvez à tout moment refuser de participer à cette étude et à la conservation des prélèvements. Votre participation à l'étude étant limitée à votre tentative d'AMP et ne modifiant en aucune façon la prise en charge médicale il n'y aura pas de période d'exclusion si vous envisagez de participer ultérieurement à une autre étude.

Cette lettre d'information vous est remise lors d'une de vos consultations afin que vous puissiez la lire et en discuter éventuellement avec le médecin de votre choix et /ou avec vos proches. Par ailleurs toute connaissance médicale nouvelle susceptible de remettre en question votre participation au protocole vous sera communiquée. Vous avez également, avant pendant et après la réalisation de l'étude, la possibilité de poser toutes les questions que vous souhaitez en vous adressant au médecin qui vous aura pris en charge pour votre AMP.

Vous serez informé des résultats globaux de l'étude à la fin de celle-ci. Vous bénéficierez également de conseils personnalisés et recevrez des documents sur les recommandations à propos du tabac pour vous et votre conjoint. Le centre d'AMP du CHU participe à l'opération maternité sans tabac. Vous pouvez consulter les référents de ce programme à la maternité du CGO

Conformément à la loi du 20 décembre 1988 modifiée relative à la protection des personnes se prêtant à la recherche biomédicale, et du décret d'application N° 91-440 du 14 mai 1991, le CHU d'Amiens, promoteur de l'étude, a souscrit une assurance couvrant les risques directs liés à l'étude dans la stricte application du protocole.

Nom de la compagnie :

Adresse :

Numéro de contrat :

Votre dossier médical reste strictement confidentiel. Il pourra être consulté par l'investigateur et son équipe médicale, les personnes mandatées par le promoteur et soumises au secret professionnel, et des personnes mandatées par les autorités sanitaires et judiciaires.

Remis le

A

Signature de l'investigateur

Annexe 6: Protocoles de stimulation ovarienne

Le but de la stimulation ovarienne était d'obtenir une réponse plurifolliculaire afin de recueillir un maximum d'ovocytes matures lors de la ponction ovarienne. Le principe était d'administrer, par le biais d'injections sous-cutanées quotidiennes, de la FSH permettant le recrutement et la croissance des follicules ovariens. Ces injections de FSH ont été associées à une seconde injection quotidienne afin d'obtenir une désensibilisation de l'hypophyse pour permettre un meilleur contrôle du cycle.

Des contrôles échographiques (épaisseur et aspect de l'endomètre, nombre et taille des follicules ovariens) et sanguins (œstradiol, LH et progestérone) ont été réalisés en parallèle des injections. Ce monitoring de l'ovulation avait pour but d'adapter la dose de FSH à la réponse ovarienne, d'évaluer le meilleur moment pour le déclenchement de l'ovulation et de prévenir le risque d'hyperstimulation ovarienne.

- **Protocole agoniste long**

Des injections quotidiennes de 0,1mg/jour de triptoréline (Décapeptyl®) ont été débutées à partir du 20^{ème} jour du cycle pendant 15 jours. Cette première partie eut pour objectif de désensibiliser l'hypophyse. Après contrôle échographique et sanguin de désensibilisation ovarienne, la triptoréline a été diminuée à 0,05mg/jour et associée à une injection quotidienne de FSH urinaire +/- LH (Fostimon®, Ménopur®) ou FSH recombinante (Gonal-F®, Puregon®). Les contrôles échographiques et sanguins étaient à réaliser en parallèle des injections à partir du 6^e jour de stimulation puis tous les 2 à 3 jours jusqu'au déclenchement de l'ovulation (figure 21).

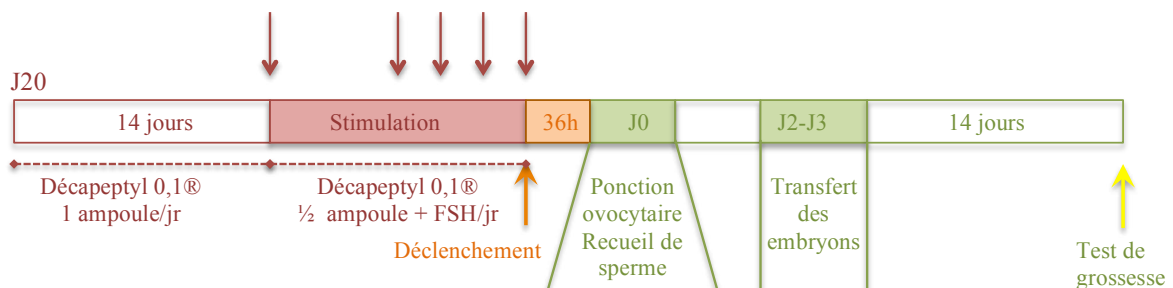


Figure 21: Protocole de stimulation agoniste long

- **Protocole antagoniste**

Une injection quotidienne de FSH a été administrée à partir du 2^{ème} jour des règles. Un premier contrôle échographique et sanguin était à réaliser au 5^e jour de stimulation. Lorsqu'un ou plusieurs follicules ovariens atteignirent un diamètre de 13-14 mm ou que le taux d'oestradiol était supérieur à 400 pg/ml, une injection supplémentaire quotidienne de 0,25 mg de cétrelix (Cétrotide®) a été introduite. Des contrôles échographiques et sanguins étaient à réaliser en parallèle des injections tous les 2 à 3 jours jusqu'au déclenchement de l'ovulation (figure 22).

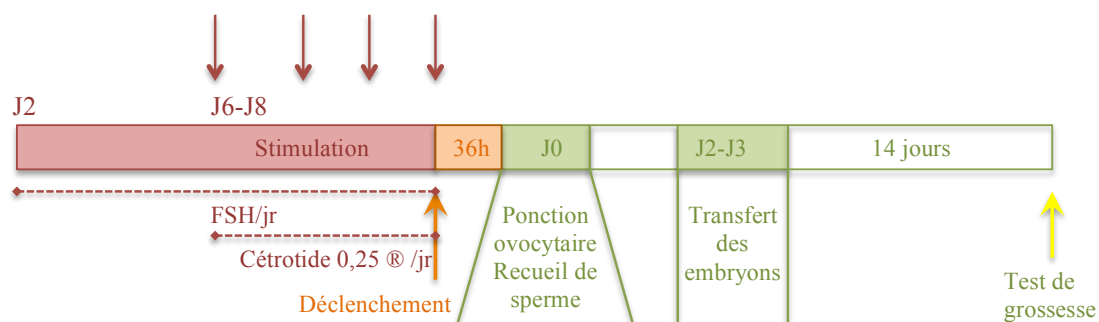


Figure 22: Protocole de stimulation antagoniste

- **Déclenchement de l'ovulation et ponction ovocytaire**

L'ovulation a été déclenchée après visualisation d'au minimum 3 follicules ovariens matures de plus de 17 millimètres lors de la surveillance échographique et observation d'une oestradiolémie cohérente avec le nombre de follicules matures. Une injection sous-cutanée de choriogonadotropine alfa (Ovitrelle®, gonadotrophine humaine) a été effectuée le soir à 21h00 à la place des précédentes injections. La ponction ovocytaire écho-guidée a été effectuée 36 heures après l'injection de choriogonadotropine alfa (Ovitrelle®), par voie vaginale, au bloc opératoire, sous anesthésie générale.

Annexe 7: Procédure habituelle de tri et de décoronisation ovocytaire

Au laboratoire de biologie de la reproduction, à la suite de la ponction ovocytaire, un tri ovocytaire a ensuite été effectué dans les LF. Il consiste à repérer et à isoler les CCO (ovocytes + cellules de la granulosa). La technique de tri ovocytaire fut menée différemment en fonction de la technique de mise en fécondation FIV ou ICSI.

- **Tri ovocytaire des ovocytes mis en fécondation en FIV**

Sous hotte à flux laminaire, sur plancher chauffant à 37°C, les seringues ont été vidées une par une dans une boîte de Pétri afin d'isoler les CCO, les LF étant au fur et à mesure replacés dans leur seringue initiale. Chaque CCO trouvé fut déposé dans un puits d'une boîte de culture stérile contenant 600 µL de milieu de culture GIVF® (Vitrolife). Ils ont ensuite été placés dans une étuve à 37°C sous atmosphère CO₂ à 5% en attendant la mise en fécondation.

La décoronisation des ovocytes mis en fécondation en FIV eut lieu à J1 de la fécondation soit le lendemain de la ponction ovocytaire.

- **Tri et décoronisation ovocytaire des ovocytes mis en fécondation en ICSI**

Les seringues ont été vidées une par une dans une boîte de Pétri afin d'isoler les CCO, les LF étant au fur et à mesure replacés dans leur seringue initiale.

Chaque CCO trouvé était déposé dans le puits numéro 1 de la boîte de tri stérile, chaque puits contenant 600 µL de milieu de culture GIVF®. Tous les CCO ont donc été placés dans le puits numéro 1 de la boîte de tri ovocytaire.

Ce tri ovocytaire a été suivi d'une décoronisation à la hyaluronidase qui a pour but de séparer les cellules de la granulosa des ovocytes. Ainsi les ovocytes étaient déposés dans le puits numéro 2 contenant de la hyaluronidase diluée au tiers dans 600 µL de milieu de culture GIVF®. Les ovocytes ont ensuite été placés dans le puits numéro 3 pour finir la décoronisation ovocyte par ovocyte de manière mécanique à l'aide d'un stripper. Les ovocytes décoronisés ont été mis pour rinçage dans le puits numéro 4 (figure 23). Ils ont ensuite été placés dans une étuve à 37°C sous atmosphère CO₂ à 5% en attendant la mise en fécondation.

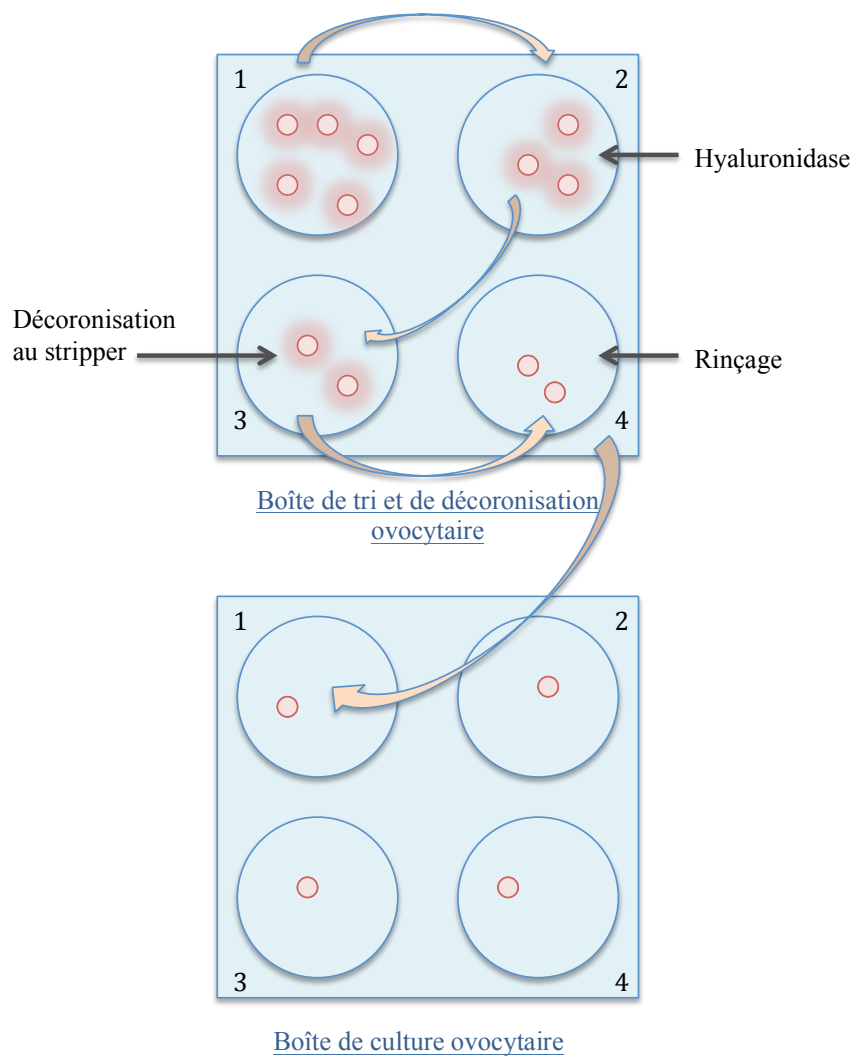


Figure 23: Tri et décoronation ovocytaire avant ICSI

Annexe 8: Protocole de FIV+/-ICSI, culture et transfert embryonnaire

- **Mise en fécondation en FIV et/ou ICSI**

Deux techniques de mise en fécondation ont pu être proposées en fonction de l'indication de l'infertilité : la FIV classique ou l'ICSI. Pour certaines patientes, la moitié de la cohorte a été mise en fécondation en FIV classique et l'autre moitié en ICSI (mi-FIV mi-ICSI).

Les spermatozoïdes ayant été recueillis par masturbation au moment de la ponction, une préparation par gradient bicouche a été réalisée pour éliminer le liquide séminal et les débris cellulaires, sélectionner les spermatozoïdes et assurer leur capacitation.

Pour la technique de FIV classique, sous hotte, les CCO non décoronisés contenus chacun dans un puits d'une boîte de culture stérile furent mis en présence de 100 000 spermatozoïdes préparés préalablement. Les boîtes de culture ont ensuite été placées dans l'étuve à 37°C sous atmosphère CO₂ à 5%.

La décoronisation des ovocytes a été réalisée à J1 de la mise en fécondation soit le lendemain de la ponction. Elle a été effectuée sous hotte, sur un plateau chauffant à 37° à l'aide d'un stripper. Après décoronisation, les signes de fécondation ont été recherchés : présence et nombre de pronucléus (PN), présence et nombre de globules polaires. Les ovocytes fécondés ont été transférés dans un nouveau milieu de culture G1+® (Vitrolife) et placés dans une étuve à 37°C sous atmosphère CO₂ à 5% pour mise en culture.

Pour la technique d'ICSI, les ovocytes ont été déposés dans une boîte de micro-injection chacun dans une goutte de 10µl de milieu de culture. Un spermatozoïde a été sélectionné en fonction de sa mobilité et de sa morphologie puis aspiré dans la pipette de micro-injection après immobilisation.

L'ovocyte a été maintenu par la pipette de contention à 9 heures (globule polaire à 6 ou 12 heures) et le spermatozoïde fut injecté à l'intérieur du cytoplasme de l'ovocyte.

Les ovocytes ont ensuite été placés chacun séparément dans un puits d'une boîte de culture contenant 600 µL de milieu de culture GIVF ®. Ils ont ensuite été observés à J1 de la fécondation soit le lendemain de la ponction pour rechercher les signes de fécondation (ovocytes à 2PN et 2GP). Les ovocytes fécondés ont été transférés dans un nouveau milieu de culture G1+® et placés dans une étuve à 37°C sous atmosphère CO₂ à 5% pour mise en culture.

- **Culture embryonnaire**

La culture des embryons a pu se poursuivre jusqu'au cinquième (J5) ou sixième (J6) jour après la ponction. Au deuxième (J2) et troisième (J3) jour après la mise en fécondation, les embryons ont été observés et un score leur était attribué selon le consensus d'Istanbul (493). Le nombre de blastomères, l'aspect et la régularité des blastomères et la présence de masses intracytoplasmiques anucléées sont les 3 critères constituant ce score de qualité embryonnaire défini par les lettres A, B, C et D. La lettre A définit les embryons de qualité supérieure et la lettre D ceux de mauvaise qualité.

Si une culture prolongée était envisagée (culture jusqu'à J5 ou J6 après la mise en fécondation), les embryons étaient placés dans un milieu de culture adapté G2+® (Vitrolife). Au quatrième jour de développement (J4), aucune observation n'était réalisée. À J5 et J6, la qualité embryonnaire était appréciée selon la classification de Gardner (494) avec l'évaluation du degré d'expansion du blastocèle, du développement de la masse cellulaire interne et du trophoblaste.

- **Transfert embryonnaire**

Le transfert intra-utérin des embryons a été réalisé si une qualité embryonnaire correcte était observée. Le jour du transfert et le nombre d'embryons transférés ont été définis en fonction des antécédents du couple et de la qualité des embryons.

Un traitement complémentaire par progestérone intravaginale (Utrogestan® 400mg, Besins, France) était prescrit à partir du soir la ponction ovocytaire jusqu'au jour du test de grossesse. Ce test de grossesse a été réalisé 15 jours après le transfert, par un dosage des β hCG plasmatique.

En cas de positivité, un contrôle du taux de β HCG était prévu une semaine après le premier test. Une échographie de l'évolutivité de la grossesse et du nombre d'embryons intra-utérins était proposée 6 semaines après le transfert des embryons.

Une congélation embryonnaire a été proposée au couple en cas d'embryons surnuméraires de bonne qualité.

Annexe 9: Tri et décoronisation ovocytaire des ovocytes mis en fécondation en ICSI prélevés par la technique « individualisée »

Les seringues ont été vidées une par une dans une boîte de Pétri afin d'isoler les CCO, les LF étant remplacés au fur et à mesure dans leur seringue initiale. Chaque CCO trouvé par seringue a été déposé dans un puits contenant 600 µL de GIVF® d'une boîte de tri ovocytaire avec indication du numéro de la seringue d'où il provenait.

Ce tri ovocytaire a lui aussi été suivi de la même technique de décoronisation décrite dans l'Annexe 7. Cependant les ovocytes ont été décoronisés un par un et le numéro de seringue dont était issu l'ovocyte a été inscrit sur la feuille de paillasse ainsi que sur la fiche de suivi des seringues (figure 24).

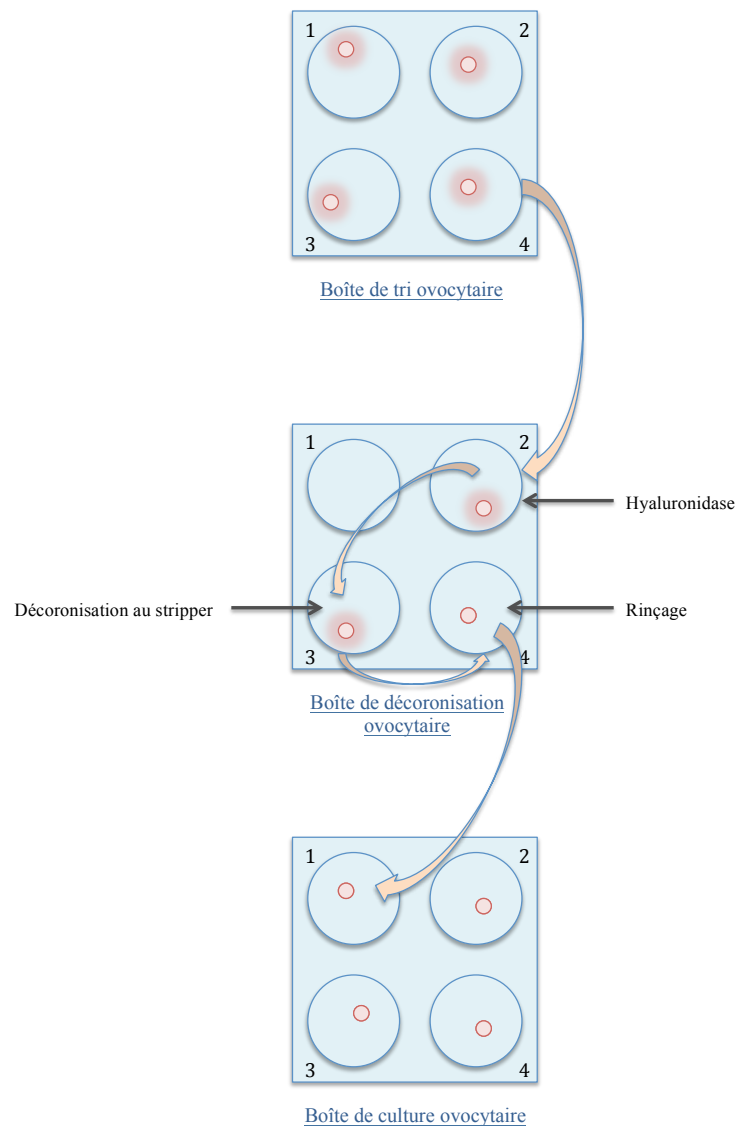


Figure 24: Tri ovocytaire et décoronisation ovocytaire pour les seringues « individualisées »

Résumé

Objectif :

Les objectifs de ce travail étaient : - de déterminer les concentrations des hormones de l'axe thyroïdienne, somatotrope et de la vitamine D dans le liquide folliculaire (LF), ainsi que la présence d'anticorps antithyroïdiens (ACAT) ; - et d'analyser les associations de ces données avec les différents paramètres de fécondation in vitro (FIV).

Matériel et méthodes :

Une étude prospective a été menée dans le service de Médecine et Biologie de la Reproduction du CHU-Amiens Picardie. Les couples inclus étaient ceux bénéficiant d'une 1^{ère} ou 2^{ème} tentative de FIV. Les femmes incluses étaient euthyroïdiennes et de moins de 36 ans, les hommes devaient être âgés de moins de 45 ans avec une numération spermatique supérieure à $5 \times 10^6/\text{ml}$.

Le dosage de la thyroïd stimulating hormone (TSH), la triiodothyronine libre (T3L), thyroxine libre (T4L), l'hormone de croissance (GH), l'insulin-like growth factor 1 (IGF1), la 25 hydroxyvitamine D (25(OH)D) et des anticorps anti-thyroperoxydase (TPO) et anti-thyroglobuline (TG) a été réalisé dans les LF et le sérum le jour de la ponction ovocytaire. 3 analyses ont été réalisées à la recherche :

- D'une corrélation entre les taux folliculaires et sériques,
- D'une association entre les taux folliculaires et la qualité d'une cohorte ovocytaire,
- D'une association entre les taux folliculaires et les issues de tentatives de FIV.

Résultats :

Une corrélation positive a été observée entre les taux sériques et folliculaires pour les hormones TSH, T3L, T4L, IGF1, 25(OH)D et les ACAT, mais pas pour la GH.

Lors de l'analyse d'une cohorte d'ovocytes, une moindre proportion d'anomalies morphologiques ovocytaires est associée à des concentrations folliculaires plus élevées en GH et IGF1.

L'obtention d'une grossesse en FIV est associée à une plus haute concentration folliculaire en 25(OH)D.

Conclusion :

Les concentrations en GH, IGF1 et 25(OH)D folliculaires sont associées aux résultats de tentatives de FIV +/- ICSI dans notre population. Il serait nécessaire de confirmer nos résultats dans une plus large cohorte.

Mots clés : Fécondation in vitro, liquide folliculaire, thyroïd stimulating hormone, hormones thyroïdiennes, anticorps antithyroïdiens, hormone de croissance, insulin-like growth factor 1, 25 hydroxyvitamine D, anomalies morphologiques ovocytaires

Abstract

Objective:

The objectives of this work were: - to determine the concentrations of the thyrotropic and somatotropic axis hormones and vitamin D in follicular fluid (FF), as well as the presence of antithyroid antibodies (ATA); - and to analyze the associations of these data with various parameters of in vitro fecundation (IVF).

Material and methods:

A prospective study was conducted in the Reproductive Medicine and Biology department of the CHU-Amiens Picardie. The couples benefiting from a first or second IVF cycles were included. The women included were euthyroid and under 36 years old, the men had to be under 45 years old with a sperm count greater than $5 \times 10^6/\text{ml}$.

The assay of thyroid stimulating hormone (TSH), free triiodothyronine (fT3), free thyroxine (fT4), growth hormone (GH), insulin-like growth factor 1 (IGF1), 25 hydroxyvitamin D (25OHD) and anti-thyroperoxidase (TPO) and anti-thyroglobulin (TG) antibodies were obtained in FF and serum on the day of oocyte retrieval. 3 analyzes were carried out:

- A correlation between follicular and serum levels,
- An association between follicular levels and the quality of an oocyte cohort,
- An association between follicular levels and IVF outcomes.

Results:

A positive correlation was observed between serum and follicular levels for the hormones TSH, T3L, T4L, IGF1, 25OHD and ACAT, but not for GH.

When analyzing a cohort of oocytes, a lower proportion of oocyte morphological abnormalities is associated with a higher follicular level of GH and IGF1.

Obtaining a pregnancy after IVF is associated with a higher follicular 25OHD levels.

Conclusion:

Follicular GH, IGF1, and 25OHD are associated with the results of IVF +/- ICSI cycles in our population. It would be necessary to confirm our results in a larger cohort.

Key words: in vitro fecundation, follicular fluid, thyroïd stimulating hormone, thyroid hormones, antithyroid antibodies, growth hormone, insulin-like growth factor 1, 25-hydroxy vitamin D, oocyte morphological abnormality