



Université Lille 2
Droit et Santé

UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2014

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

INFLUENCE DE LA SUPPLEMENTATION EN VITAMINE D CHEZ DES
PATIENTES CARENCEES SUR LES TAUX SERIQUES D'HORMONE
ANTI-MULLERIENNE

Présentée et soutenue publiquement le 16 juin à 14h00

au Pôle Recherche

Par Hélène CAPPY

JURY

Président : **Monsieur le Professeur Didier DEWAILLY**

Assesseurs : **Monsieur le Professeur Pascal PIGNY**
Monsieur le Docteur Vincent PREVOT
Madame le Docteur Maryse LEROY-BILLIARD

Directeur de Thèse : **Madame le Docteur Sophie JONARD-CATTEAU**

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

TABLES DES MATIERES

ABRÉVIATIONS.....	2
INTRODUCTION.....	3
I. AMH et syndrome des ovaires polymicrokystiques.....	3
1. Le syndrome des ovaires polymicrokystiques.....	3
2. L'hormone anti-Müllérienne.....	4
II. Vitamine D : Propriétés générales, métabolisme et prévalence du déficit.....	6
1. Caractéristiques générales.....	6
2. Métabolisme.....	6
3. Effets biologiques.....	8
4. Prévalence du déficit en vitamine D en France	9
III. Vitamine D et fertilité.....	10
1. Modèle animal et expérimentation in vitro.....	10
2. Vitamine D et issues en Fécondation In Vitro.....	12
3. Vitamine D et fertilité.....	13
IV. Vitamine D et AMH.....	14
1. Taux de 25(OH)D sériques et corrélation avec les taux d'AMH sériques.....	14
2. Régulation in vitro de l'expression de l'AMH par la vitamine D3.....	14
V. Vitamine D, SOPK et métabolisme glucidique.....	15
1. Vitamine D, SOPK et insulino-résistance.....	15
2. Vitamine D et métabolisme glucidique.....	17
VI. Vitamine D et statut pondéral.....	18
OBJECTIFS.....	19
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	20
ARTICLE.....	25
CONCLUSION.....	49

ABREVIATIONS

AMH : Hormone Anti-Müllérienne

ANOVA : Analysis of variance

ASRM : American Society for Reproductive Medecine

BMI : Body Mass Index

CFA : Compte Folliculaire Antral

CLIA : ChemoLuminescence ImmunoAssay

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embryology

FIV : Fécondation In Vitro

FSH : Follicle Stimulating hormones

IL : Interleukine

IMC : Indice de Masse Corporel

LH : Luteinizing Hormone

KO : Knock –out

MIS : Mullerian Inhibiting Substance

PTH : Parathormone

SDHEA : Sulfate de Déhydroépiandrosterone

SOPK : Syndrome des ovaires polymicrokystiques

TGF : Transforming Growth Factor

VDR : Vitamin D receptor

25(OH)D : 25-hydroxyvitamine D

1,25(OH)₂D : 1,25-dihydroxyvitamine D

INTRODUCTION

Le rôle de l'hormone anti-Müllérienne (AMH) dans la physiologie ovarienne a été très étudié ces dernières années, en particulier son rôle dans la régulation de la folliculogénèse. La mise en évidence de taux anormalement élevés d'AMH dans le syndrome des ovaires polymicrokystiques a été une avancée dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de cette affection. Les régulateurs de la sécrétion d'AMH par les follicules sont encore mal élucidés. La vitamine D pourrait être un de ces régulateurs.

En effet, le lien entre vitamine D et fertilité a été discuté dans de nombreuses publications. La découverte d'un élément de réponse à la vitamine D sur le promoteur du gène de l'AMH et le peu de données disponibles sur le lien entre vitamine D et taux d'AMH sériques ont suscité l'intérêt de ce travail.

1. AMH et syndrome des ovaires polymicrokystiques

1. Le syndrome des ovaires poly-microkystiques

Le syndrome des ovaires polymicrokystiques (SOPK) est le trouble le plus fréquence de fertilité féminine. Il est présent chez 6 à 15% des femmes (1). Il a été défini en 2003 lors du consensus de Rotterdam par l'association de 2 critères parmi les 3 suivants : oligo-anovulation, signes cliniques et/ou biologiques d'hyperandrogénie, ovaires polymicrokystiques (présence d'au moins 12 follicules de 2-9mm de diamètre et/ou augmentation du volume ovarien >10 ml), après exclusion

des diagnostics différentiels (hyperplasie congénitale des surrénales, tumeurs sécrétant des androgènes, syndrome de Cushing, hyperprolactinémie...).

Une actualisation de la valeur seuil du compte folliculaire antral (CFA) a été proposée en 2011 par *Dewailly et al.* (2) du fait de l'évolution technologique des échographes avec comme valeur seuil présentant la meilleure sensibilité et spécificité un CFA à 19 microfollicules par ovaire. Les taux d'AMH sériques ont également été proposés comme critères diagnostiques du SOPK avec un seuil défini par *Dewailly et al.* à 35pmol/l (2). En effet dans ce syndrome, les taux d'AMH sériques sont élevés et corrélés à l'excès de follicules ovariens de 2 à 9 mm visibles en échographie (3). Par ailleurs, chaque cellule de la granulosa sécréterait par elle-même une quantité supérieure d'AMH en comparaison aux femmes témoins (4) .

La prévalence de l'obésité chez les patientes présentant un SOPK est élevée, de 30% à 75% en fonction de séries. Un excès de graisse abdominale est fréquent chez ces patientes même pour un indice de masse corporel (IMC) normal (5). Le SOPK a été associé à une augmentation des troubles du métabolisme glucidique et de la survenue d'un syndrome métabolique (6) avec augmentation de l'insulino-résistance et de la prévalence du diabète de type 2 (7). Enfin, les femmes présentant un SOPK pourraient présenter un risque accru d'athérosclérose subclinique (8).

2. L'hormone anti-Müllérienne

L'hormone anti-Müllérienne (ou *Mullerian Inhibiting Substance*) est une glycoprotéine dimérique de 140 kDa appartenant à la superfamille du TGF β (Transforming Growth Factor β), sécrétée chez la femme par les cellules de la granulosa de l'ovaire des follicules pré-antraux et des petits follicules antraux principalement. Initialement découverte dans la physiologie de la différenciation du tractus génital mâle par

A. Jost en 1953, l'AMH est l'hormone permettant la régression des canaux de Müller par apoptose cellulaire durant l'embryogénèse. Son importance dans la physiologie ovarienne n'a été mise en évidence que plus tardivement. Elle semble être impliquée dans la folliculogénèse en empêchant l'entrée en croissance des follicules primordiaux et en limitant le recrutement folliculaire cyclique. Elle est largement utilisée en médecine de la reproduction, comme marqueur de la réserve ovarienne et son taux sérique permet d'adapter les doses de gonadotrophines utilisées en Fécondation In Vitro (FIV) et est prédictif de la réponse à la stimulation ovarienne (9). L'action de l'AMH est médiée par un récepteur spécifique, le récepteur à l'AMH de type 2. La fixation de l'AMH sur son récepteur spécifique permet le couplage à un récepteur de type 1 et induit une cascade d'activation de protéines de la famille des *Smads*, amenant à l'activation de gènes cibles et de processus physiologiques tels que l'apoptose (10,11,12).

Les régulateurs de l'expression de l'AMH au niveau du follicule ovarien sont mal connus. Certaines molécules comme les *Bone morphogenetic protein* (BMPs), déjà impliqués dans la physiologie ovarienne, ont été suggérés (13).

Des taux anormalement élevés d'AMH sont remarqués dans le syndrome des ovaires polymicrokystiques, la conséquence de cette augmentation étant probablement l'arrêt de maturation folliculaire entraînant la dysovulation présente dans ce trouble. Toutefois, les mécanismes responsables de cet excès d'AMH circulants sont mal élucidés. Récemment un élément de réponse à la vitamine D a été mis en évidence au niveau de la séquence du gène du promoteur de l'AMH (14) laissant la voie ouverte à un potentiel point de régulation, mais la conséquence physiologique de la fixation de la vitamine D sur cet élément de réponse reste méconnue.

II. Vitamine D : Propriétés générales, métabolisme et prévalence du déficit

1. Caractéristiques générales

La vitamine D est une hormone liposoluble. Ce nom est donné à deux stéroïdes : l'ergocalciférol (ou vitamine D2) et le cholécalciférol (ou vitamine D3). Ces deux composés ont une origine alimentaire restreinte (principalement dans certains aliments d'origine végétale pour la vitamine D2, les poissons et actuellement certains produits laitiers enrichis pour la vitamine D3). La vitamine D3 a également une origine endogène, issue de la conversion du 7-déhydrocholestérol en pré-vitamine D3 puis vitamine D3 sous l'action des UV dans la couche profonde de la peau (15).

2. Métabolisme

Au niveau hépatique, la vitamine D3 est hydroxylée en 25-hydroxyvitamine D3 (25(OH)D₃ ou calcifédiol) par une 25-hydroxylase (ou CYP27A1) au niveau du carbone 25. Ce métabolite, dosable dans le sérum, reflète le stock de l'organisme en vitamine D et est proportionnel à la quantité de vitamine D synthétisée, l'enzyme n'étant pas soumis à rétrocontrôle.

Au niveau rénal, la vitamine D3 est hydroxylée en forme bioactive, la 1,25 dihydroxyvitamine D3 (1,25(OH)₂D₃ ou calcitriol) sous l'action de la 1 α -hydroxylase (ou CYP27B1) (fig.1) (16,17).

Cette étape est régulée de façon positive par la parathormone (PTH), la calcitonine, l'insuline, l'IGF₁, l'hormone de croissance, les oestrogènes, l'hypocalcémie, l'hyperphosphorémie et régulée de façon négative par la 1,25(OH)₂D₃, l'hypercalcémie et les corticoïdes. Le calcitriol, quant à lui exerce un feedback négatif sur la sécrétion de PTH.

La vitamine D est une molécule liposoluble et se trouve dans le plasma sous forme liée à des protéines plasmatiques dont 99% est liée à la *Vitamin D Binding Protein* (VDBP). La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ est active sous forme libre. Elle a une demi-vie très courte (environ 4h). La vitamine D est stockée dans le tissu adipeux et les muscles principalement.

La vitamine D2 a une demi-vie circulante plus courte, une clairance plus rapide par affinité moindre pour la VDBP ce qui limite sa conversion en $25(\text{OH})\text{D}$ (16).

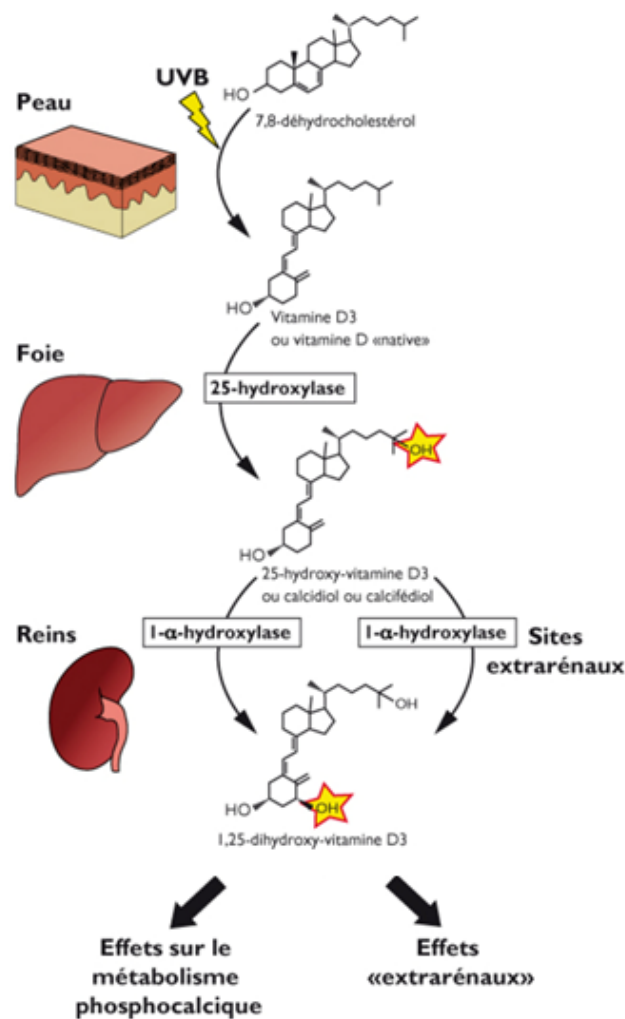


Figure 1: Biosynthèse de la vitamine D

(D'après T.Ernandez et C. Stoermann-Chopard [17])

L'expression de transcrits de la 1α -hydroxylase a été identifiée également au niveau de cellules endothéliales, du tissu osseux (ostéoblastes et chondrocytes), de cellules épithéliales (peau, sein , colon , prostate, endomètre), glandes endocrines (glandes parathyroïdes, îlots pancréatiques, placenta) , et de cellules du système immunitaire (macrophages, lymphocytes T et B) (16).

Enfin au niveau rénal, la $25(\text{OH})\text{D}_3$ et la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sont catabolisées par la 24-hydroxylase (ou CYP24A1) respectivement en 24,25-dihydroxyvitamine D_3 et 1α -24,25 $(\text{OH})_3\text{D}_3$ (ou acide calcitroïque), métabolites biologiquement inactifs. L'expression de CYP24A1 est induite par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, générant ainsi un rétrocontrôle négatif (18).

3. Effets biologiques

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se lie à un récepteur nucléaire spécifique, le VDR (*Vitamin D Receptor*), forme un hétéro-dimère avec un récepteur rétinolide X, et induit l'activation ou la répression de transcription de gènes cibles en se fixant à des éléments de réponse à la vitamine D (VDRE ou *Vitamin D Response Element*) (15).

Un mode d'action non génomique de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ a également été décrit, action rapide impliquant des phénomènes membranaires comme des flux de calcium, l'augmentation de la protéine C ou encore l'activation de la voie de signalisation MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) (19).

L'action principale de la vitamine D est l'absorption intestinale et rénale de calcium ainsi qu'un effet sur la formation osseuse avec un effet sur le chondrocyte et la différenciation des ostéoblastes. En pathologie, la carence sévère en vitamine D induit le rachitisme chez l'enfant et l'ostéomalacie chez l'adulte, par défaut de calcium au niveau des os.

Toutefois, le récepteur de la vitamine D a été retrouvé dans de nombreux types cellulaires et tissus tels que les cellules β -pancréatiques, certains neurones, les cellules endothéliales, les monocytes, les cellules endométriales.

Depuis quelques années, des études se sont focalisées sur l'implication de la vitamine D dans la pathogénèse de maladies extra-squelettiques telles que les pathologies cardio-vasculaires, auto-immunes ou encore carcinologiques. L'activation du VDR serait impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et dans la différenciation dans certains types cellulaires (15). Les études sur la souris knock-out pour le VDR retrouvent une augmentation de la susceptibilité aux maladies auto-immunes comme les maladies inflammatoires du tube digestif après exposition à des facteurs prédisposants malgré un système immunitaire globalement normal, une sensibilité accrue aux tumeurs induites par les oncogènes et carcinogènes chimiques. La souris VDR-KO développe également plus d'hypertension artérielle, d'hypertrophie cardiaque et une thrombogénicité accrue (20) .

4. Prévalence du déficit en vitamine D en France

En 2012, l'institut de veille sanitaire publiait les résultats portant sur l'étude du statut vitaminique de 1587 adultes non supplémentés en France : 80,1% des adultes présentaient une insuffisance (taux de 25(OH)D sériques < 30 ng/ml) dont 42,5% une carence modérée (10 ng/ml < taux sériques de 25(OH)D < 20 ng/ml) et 4,8% une carence sévère (taux sériques de 25(OH)D <10 ng/ml).

III. Vitamine D et fertilité

La relation entre vitamine D et fertilité est au centre de nombreuses publications. Le récepteur de la vitamine D et les enzymes de métabolisation de la vitamine D ont été identifiées dans les tissus impliqués dans la reproduction chez la femme : des transcrits du VDR ont été identifiés dans les cellules de la granulosa de l'ovaire, dans les cellules endométriales et dans la glande pituitaire (21). Le VDR et l'enzyme 1α -hydroxylase ont été retrouvés au niveau du placenta et des cellules endométriales humaines (15) .

1. Modèle animal et expérimentation in vitro

La souris VDR-KO femelle présente une hypoplasie utérine et une altération de la folliculogénèse (22). Les rates carencées pour la vitamine D présentent une diminution de la fertilité de 75% (23). Cette hypofertilité pourrait être en lien avec l'hypocalcémie présente chez ces femelles (20).

La carence en vitamine D pourrait induire des altérations du calcium intracellulaire et ainsi induire une dysfonction ovarienne et ovulatoire. La vitamine D pourrait réguler la folliculogénèse. *In vitro*, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ modifierait la signalisation de l'AMH et la stéroïdogénèse dans les cellules de granulosa du cumulus dans l'espèce humaine. Le traitement de cellules de la granulosa humaine par la vitamine D3 induirait une diminution des transcrits du récepteur de l'AMH de type 2 et du récepteur de la FSH (24). *Potashnik et al.* (25) ont suggéré à l'aide de dosage de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dans le sérum ainsi que dans le liquide folliculaire de patientes traitées en FIV, que l'augmentation des taux d'oestradiol liée à la stimulation ovarienne par les gonadotrophines exogènes était associée à une augmentation des taux sériques de

1,25(OH)₂D₃ et que ces derniers étaient fortement corrélés aux taux de 1,25(OH)₂D₃ présents dans le liquide folliculaire.

La 1,25(OH)₂D₃ modulerait également la production de progestérone dans les cellules de la granulosa porcines (26). Des études animales suggèrent un rôle de la vitamine D₃ dans la synthèse des œstrogènes, médié par la maintien du calcium intracellulaire ou par régulation de l'expression du gène de l'aromatase (27).

La 1,25(OH)₂D₃ et l'insuline agiraient de façon synergique pour augmenter significativement la production d'oestradiol de 60% lors de stimulations conjointes dans des cultures de cellules de granulosa humaine, laissant penser que la vitamine D pourrait stimuler la stéroïdogénèse ovarienne (28).

Au niveau endométrial, la forme active de la 1 α -hydroxylase, enzyme catalysant la synthèse de la 1,25(OH)₂D₃ est exprimée au niveau des cellules endométriales stromales humaines indépendamment de la phase du cycle, mais avec une augmentation significative au niveau de la décidue lors de la grossesse débutante.

La stimulation de ces cellules par une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans le dialogue endomètre et embryon pré-implantatoire, l'Interleukine-1 β , entraîne une augmentation des transcrits de la 1 α -hydroxylase. La forme active de la vitamine D₃ peut quant à elle, moduler l'expression de l'ostéopontine, protéine d'adhérence impliquée dans la décidualisation liée au processus d'invasion par le conceptus (29).

Les cellules déciduales humaines synthétiseraient la 1,25(OH)₂D₃ et pourraient agir de façon paracrine pour moduler les phénomènes immunitaires impliqués dans l'implantation et le dialogue embryon-endomètre. En effet, *Evans et al.* (30) ont traité des cellules Natural Killer en provenance de la décidue par de la 1,25(OH)₂D₃ ou de la 25(OH)D₃ et observé une modulation d'expression de certaines cytokines

(interleukin-6, tumor necrosis factor α , colony stimulating factor 2) impliquées dans l'implantation.

2. Vitamine D et issues en Fécondation In Vitro

Certains auteurs ont étudié la relation entre vitamine D et succès en procréation médicalement assistée, notamment en FIV. La présence de métabolites de la vitamine D a été retrouvée dans les fluides folliculaires de patientes en FIV.

L'étude des taux de 25(OH)D dans le liquide folliculaire a mis en évidence des taux d'implantation et de grossesse clinique significativement plus élevés chez les patientes présentant des taux plus élevés de 25(OH)D sériques et folliculaires sans différence sur l'âge et l'IMC. Le taux de 25(OH)D folliculaire était un facteur prédicteur indépendant de succès en FIV (31). *Rudick et al.* (32) ont retrouvé une corrélation entre le statut en 25(OH)D (carence, insuffisance vitaminique, taux normal) et les issues en FIV probablement médiée par l'endomètre : en effet, cette étude retrouvait que la carence en vitamine D était associée à des taux de grossesses plus bas dans une population de femmes blanches non-hispaniques, mais non corrélée aux paramètres de la stimulation ovarienne ou à la qualité embryonnaire.

La possibilité d'une influence de la vitamine D dans le dialogue entre embryon et l'endomètre et son influence dans les issues en FIV a été étudié *in vivo*, notamment chez des receveuses en dons d'ovocytes avec des taux de naissances vivantes de 31% chez les patientes carencées (25(OH)D < 20 ng/ml) (n=26) et de 59% chez les patientes non carencées (25(OH)D > 30 ng/ml) (n=35) (33).

3. Vitamine D et fertilité

La supplémentation calcique pourrait améliorer le trouble du cycle chez les patientes avec SOPK laissant suggérer par certains auteurs que les anomalies de l'homéostasie calcique pourraient contribuer à la physiopathologie du SOPK (34). *Wehr et al.* ont montré une amélioration dans la régularité des cycles après supplémentation en vitamine D (25(OH)D₃ : 20 000 UI/semaine pendant 24 semaines) avec amélioration chez 50% des patientes oligo-aménorrhéiques (35). Dans une étude avec 91 patientes anovulantes présentant un SOPK avec induction de l'ovulation par citrate de clomifène, la carence en vitamine D était un facteur prédictif indépendant négatif de l'issue de la stimulation en terme de développement folliculaire et de taux de grossesse (36). Enfin, des taux bas de 25(OH)D sériques chez la femme ont également été associés à une augmentation du risque de fausse couche tardive (37).

IV. Vitamine D et AMH :

1. Taux de 25(OH)D sériques et corrélation avec les taux d'AMH sériques

Peu d'études se sont focalisées sur l'influence de la vitamine D sur la sécrétion d'AMH ou sur les taux d'AMH sériques.

Dennis et al. (38) ont étudié le lien entre taux d'AMH sériques et statut vitaminique D chez des femmes de 19 à 39 ans. Les patients bénéficiaient d'une supplémentation quotidienne en ergocalciférol, cholécalciférol ou un placebo durant 6 mois et l'étude analysait les taux sériques d'AMH et de 25(OH)D avant et après traitement. Chez les patientes recevant un placebo, les résultats montraient une variation saisonnière de l'AMH et de la vitamine D, avec décroissance de 18% des taux d'AMH en hiver en comparaison à l'été ($p=0,01$). La variation des taux d'AMH était corrélée avec l'amplitude de la variation des taux de vitamine D ($p=0,004$; $r=0,36$). Cette variation était atténuée chez les patientes traitées par vitamine D. L'équipe concluait que la supplémentation par cholécalciférol prévenait les variations saisonnières d'AMH et que la carence en vitamine D devrait être analysée lors d'un dosage d'AMH à visée diagnostique.

Merhi et al. (39) ont montré que les taux de 25(OH)D circulant étaient corrélés positivement aux taux d'AMH sériques chez les patientes de 40 ans et plus et cela après ajustement sur l'IMC, dans une analyse de 388 patientes.

2. Régulation in vitro de l'expression de l'AMH par la vitamine D3

Wojtusik et Johnson (40) ont étudié la régulation de l'expression des transcrits de l'AMH par la vitamine D3 chez la poule. Ils ont réalisé des cultures primaires cellulaires de cellules de granulosa extraites à partir de follicules antraux et traité ces

cultures par des doses croissantes de 1,25(OH)D₃ (0, 10nM et 100nM). La réalisation de PCR en temps réel a permis l'étude de l'expression des transcrits de l'AMH après traitement. Les résultats retrouvaient une décroissance dose-dépendante dans l'expression de l'ARN messager de l'AMH en réponse à la vitamine D. Ils ont émis l'hypothèse d'une régulation de la sélection folliculaire par la vitamine D.

Malloy et al (14) ont étudié les effets régulateurs de la 1,25(OH)D₃ sur l'expression de l'AMH dans une lignée de cellules cancéreuses (HeLa cells). Ils ont identifié un élément de réponse à la vitamine D sur la séquence du promoteur du gène de l'AMH humain. Le clonage de ce promoteur de l'AMH humain dans la lignée HeLA a permis de montrer l'activation du promoteur par la 1,25(OH)D₃. La mutation ou délétion de cet élément de réponse entraînait alors une diminution de la transactivation induite par la 1,25(OH)₂D₃. L'expression de l'AMH pourrait donc être up-régulée via cet élément de réponse.

V. Vitamine D, SOPK et métabolisme glucidique

1. Vitamine D, SOPK et insulino-résistance

De récentes études se sont focalisées sur le lien entre vitamine D et syndrome des ovaires polymicrokystiques et plus particulièrement sur le rôle de la vitamine D dans la pathogénèse des troubles du métabolisme glucidique fréquents dans cette pathologie.

Les résultats de la littérature sont assez hétérogènes. Dans une cohorte de 120 patientes présentant un SOPK, *Hahn et al.* (41) ont mesuré les taux sériques de

25(OH)D et les ont comparés aux paramètres métaboliques. Cette étude retrouvait une corrélation négative entre 25(OH)D et BMI, poids, et index d'insulino-résistance.

Selimoglu et al. (42) se sont intéressés au rôle de la supplémentation en vitamine D sur l'insulino-résistance chez des femmes obèses, insulino-résistantes et présentant un SOPK. Trois semaines après administration de 300 000 UI de 25(OH)D₃, le degré d'insulino-résistance représenté par le HOMA-IR (homeostasis model assessment) diminuait significativement ($p=0,043$).

À l'opposé, une récente étude randomisée contre placebo a étudié la supplémentation en vitamine D₃ à haute dose (12 000 UI par jour) pendant 12 semaines chez des patientes présentant un SOPK et comparé l'insulino-sensibilité, représentée par un index intégrant l'insulinémie et la glycémie à jeun. Aucune différence significative n'a été retrouvée concernant l'insulino-sensibilité après traitement, mais une tendance à la diminution de l'insulinémie et de la glycémie 2 heures après un test de tolérance au glucose (75g) (43).

Dans une cohorte de jeunes patients, la carence en vitamine D a été associée à un index quantitatif d'insulino-sensibilité bas (QUICKI *quantitative insulin-sensitivity check index*) chez les patientes présentant un SOPK comme chez les patientes contrôles (44).

Enfin sur le plan génétique, *Wehr et al.* (45) ont étudié dans une cohorte de 545 patientes SOPK et de 145 contrôles, l'association entre les polymorphismes du VDR et les taux de vitamine D associés à certains variants génotypiques. Ils concluaient que certains polymorphismes de VDR étaient associés à des taux plasmatiques de vitamine D plus bas, corrélés négativement à l'index d'insulino-résistance sans toutefois qu'aucun variant génétique ne soit associé à une susceptibilité au SOPK.

La carence en vitamine D pourrait donc être associée à une insulino-résistance plus importante sans toutefois que le lien soit établi spécifiquement chez les patientes présentant un SOPK.

2. Vitamine D et métabolisme glucidique

D'autres études se sont focalisées sur les effets de la supplémentation en vitamine D sur le métabolisme glucidique. Chez des patients pré-diabétiques (46), il a été montré une amélioration de l'insulino-résistance ou des paramètres glucidiques. Chez des patientes présentant un diabète gestationnel (47), on note une diminution de l'insulino-résistance et amélioration de l'insulino-sensibilité après supplémentation en vitamine D.

Par ailleurs, dans une cohorte de 12700 participants, des taux bas de 25(OH)D ont été associés avec le pré-diabète défini après hyperglycémie par voie orale, glycémie à jeun ou hémoglobine glycosylée (48). Enfin, des variants génétiques d'une enzyme de production endogène de vitamine D (7-dehydrocholesterol reductase) entraînant des taux bas de 25(OH)D plasmatiques ont été associés à une augmentation du risque de diabète de type 2 ($p=0,04$) et les concentrations basses de 25(OH)D pourraient être un médiateur entre obésité et augmentation du risque de diabète (48).

In vitro, dans les cellules β -pancréatiques de rats, la carence en vitamine D prolongée affecte la voie de la glycolyse et diminue l'utilisation du glucose par les îlots pancréatiques (49). Le traitement d'une lignée cellulaire de monocytes par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induirait une activation de la transcription du gène du récepteur de l'insuline (50).

VI. Vitamine D et statut pondéral

Plusieurs études ont suggéré un lien entre carence en vitamine D et obésité. Les individus présentant une obésité ont des taux de 25(OH)D circulant plus bas (51,52) que les individus de poids normal. Le poids serait également un facteur prédictif important de l'augmentation des taux sériques de 25(OH)D chez les individus présentant une supplémentation vitaminique (53).

L'expression des gènes du VDR et de la 1 α -hydroxylase a été mise en évidence dans des adipocytes murins et humains. La vitamine D pourrait inhiber les facteurs de transcriptions impliqués dans l'adipogénèse et moduler la lipolyse (54,55,56). Toutefois ces effets ont été suggérés par des études *in vitro*. Les études cliniques concernant la supplémentation en vitamine D et la perte de poids montrent des résultats hétérogènes. La supplémentation en vitamine D3 chez des patients obèses en période de régime n'augmente pas la perte de poids en comparaison au placebo dans l'étude de *Mason et al.* (57). *Ortega et al.* (58) ont montré que les taux de 25(OH)D sériques sont prédictifs de la perte de poids chez des sujets obèses soumis à un régime hypocalorique avec perte de poids plus importante chez les sujets présentant des taux de 25(OH) initiaux plus élevés.

Enfin, il a également été suggéré que les taux bas de vitamine D pourraient être dus à une séquestration de celle-ci dans le tissu adipeux chez les individus obèses (59).

OBJECTIFS

L'objectif de ce travail est l'étude de l'influence de la supplémentation systématique en vitamine D3 chez des femmes infertiles carencées sur les taux d'AMH sériques. Les taux sériques des hormones calcitropes ($25(\text{OH})\text{D}$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ et PTH) ont été dosés avant et après supplémentation pour étudier la corrélation avec les taux d'AMH sériques. Nous avons étudié si la supplémentation en vitamine D3 pourrait influencer les taux d'AMH sériques en fonction du statut ovarien, particulièrement chez des patientes présentant un syndrome des ovaires polymicrokystiques et chez des patientes à réserve ovarienne normale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Fauser BCJM, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril*. 2012 Jan;97(1):28–38.e25.
2. Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, et al. Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2011 Nov;26(11):3123–9.
3. Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Serum anti-Müllerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Mar;91(3):941–5.
4. Catteau-Jonard S, Jamin SP, Leclerc A, Gonzalès J, Dewailly D, di Clemente N. Anti-Müllerian hormone, its receptor, FSH receptor, and androgen receptor genes are overexpressed by granulosa cells from stimulated follicles in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Nov;93(11):4456–61.
5. Pasquali R, Gambineri A, Pagotto U. The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2006 Oct;113(10):1148–59.
6. Moran LJ, Misso ML, Wild RA, Norman RJ. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2010 Aug;16(4):347–63.
7. Sirmans SM, Pate KA. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Epidemiol*. 2013;6:1–13.
8. Dokras A. Cardiovascular disease risk in women with PCOS. *Steroids*. 2013 Aug;78(8):773–6.
9. La Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, Fauser BC, Macklon NS, ESHRE Special Interest Group for Reproductive Endocrinology--AMH Round Table. Anti-Müllerian hormone (AMH): what do we still need to know? *Hum Reprod Oxf Engl*. 2009 Sep;24(9):2264–75.
10. Visser JA. AMH signaling: from receptor to target gene. *Mol Cell Endocrinol*. 2003 Dec 15;211(1-2):65–73.
11. Van Houten ELAF, Themmen APN, Visser JA. Anti-Müllerian hormone (AMH): regulator and marker of ovarian function. *Ann Endocrinol*. 2010 May;71(3):191–7.
12. Allard S, Adin P, Gouédard L, di Clemente N, Josso N, Orgebin-Crist MC, et al. Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of beta-catenin. *Dev Camb Engl*. 2000 Aug;127(15):3349–60.

13. Ogura-Nose S, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Hiroi H, Yano T, et al. Anti-Mullerian hormone (AMH) is induced by bone morphogenetic protein (BMP) cytokines in human granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012 Sep;164(1):44–7.
14. Malloy PJ, Peng L, Wang J, Feldman D. Interaction of the vitamin D receptor with a vitamin D response element in the Mullerian-inhibiting substance (MIS) promoter: regulation of MIS expression by calcitriol in prostate cancer cells. *Endocrinology.* 2009 Apr;150(4):1580–7.
15. Anagnostis P, Karras S, Goulis DG. Vitamin D in human reproduction: a narrative review. *Int J Clin Pract.* 2013 Mar 1;67(3):225–35.
16. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol.* 2014 Mar 20;21(3):319–29.
17. Hernandez T, Stoermann-Chopard C. [Vitamin D and chronic kidney disease: increasing role for an old vitamin]. *Rev Médicale Suisse.* 2012 Nov 7;8(361):2140–5.
18. Kundu R, Chain BM, Coussens AK, Khoo B, Noursadeghi M. Regulation of CYP27B1 and CYP24A1 hydroxylases limits cell-autonomous activation of vitamin D in dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2014 Feb 15;
19. Omdahl JL, Morris HA, May BK. Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:139–66.
20. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. *Endocr Rev.* 2008 Oct;29(6):726–76.
21. Lerchbaum E, Obermayer-Pietsch B. Vitamin D and fertility: a systematic review. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc.* 2012 May;166(5):765–78.
22. Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, et al. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet.* 1997 Aug;16(4):391–6.
23. 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.
24. 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 Mar 14;jc20134161.
25. 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.
26. 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.
27. 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.

28. 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 Métabolisme*. 2010 Sep;42(10):754–7.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Thys-Jacobs S, Donovan D, Papadopoulos A, Sarrel P, Bilezikian JP. Vitamin D and calcium dysregulation in the polycystic ovarian syndrome. *Steroids*. 1999 Jun;64(6):430–5.
35. Wehr E, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B. Effect of vitamin D3 treatment on glucose metabolism and menstrual frequency in polycystic ovary syndrome women: a pilot study. *J Endocrinol Invest*. 2011 Nov;34(10):757–63.
36. Ott J, Wattar L, Kurz C, Seemann R, Huber JC, Mayerhofer K, et al. Parameters for calcium metabolism in women with polycystic ovary syndrome who undergo clomiphene citrate stimulation: a prospective cohort study. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc*. 2012 May;166(5):897–902.
37. Møller UK, Streym S, Heickendorff L, Mosekilde L, Rejnmark L. Effects of 25OHD concentrations on chances of pregnancy and pregnancy outcomes: a cohort study in healthy Danish women. *Eur J Clin Nutr*. 2012 Jul;66(7):862–8.
38. 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.
39. 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.
40. Wojtusik J, Johnson PA. Vitamin D regulates anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells of the hen. *Biol Reprod*. 2012 Mar;86(3):91.

41. Hahn S, Haselhorst U, Tan S, Quadbeck B, Schmidt M, Roesler S, et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with insulin resistance and obesity in women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc.* 2006 Nov;114(10):577–83.
42. Selimoglu H, Duran C, Kiyici S, Ersoy C, Guclu M, Ozkaya G, et al. The effect of vitamin D replacement therapy on insulin resistance and androgen levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2010 Apr;33(4):234–8.
43. Raja-Khan N, Shah J, Stetter CM, Lott MEJ, Kunselman AR, Dodson WC, et al. High-dose vitamin D supplementation and measures of insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, controlled pilot trial. *Fertil Steril* 2014 Apr 21
44. Ngo DTM, Chan WP, Rajendran S, Heresztyn T, Amarasekera A, Sverdlov AL, et al. Determinants of insulin responsiveness in young women: Impact of polycystic ovarian syndrome, nitric oxide, and vitamin D. *Nitric Oxide Biol Chem Off J Nitric Oxide Soc.* 2011 Oct 30;25(3):326–30.
45. Wehr E, Trummer O, Giuliani A, Gruber H-J, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B. Vitamin D-associated polymorphisms are related to insulin resistance and vitamin D deficiency in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc.* 2011 May;164(5):741–9.
46. H P, O C, DA U, O G, Ng D. The impact of Vitamin D Replacement on Glucose Metabolism. *Pak J Med Sci.* 2013 Nov;29(6):1311–4.
47. Asemi Z, Hashemi T, Karamali M, Samimi M, Esmailzadeh A. Effects of vitamin D supplementation on glucose metabolism, lipid concentrations, inflammation, and oxidative stress in gestational diabetes: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Am J Clin Nutr.* 2013 Dec;98(6):1425–32.
48. Afzal S, Brøndum-Jacobsen P, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Vitamin D concentration, obesity, and risk of diabetes: a mendelian randomisation study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014 Apr;2(4):298–306.
49. Billaudel B, Barakat L, Faure-Dussert A. Vitamin D3 deficiency and alterations of glucose metabolism in rat endocrine pancreas. *Diabetes Metab.* 1998 Sep;24(4):344–50.
50. Maestro B, Molero S, Bajo S, Dávila N, Calle C. Transcriptional activation of the human insulin receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Cell Biochem Funct.* 2002 Sep;20(3):227–32.
51. Parikh SJ, Edelman M, Uwaifo GI, Freedman RJ, Semega-Janneh M, Reynolds J, et al. The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Mar;89(3):1196–9.
52. Tsakova AD, Gateva AT, Kamenov ZA. 25(OH) vitamin D levels in premenopausal women with polycystic ovary syndrome and/or obesity. *Int J Vitam Nutr Res Int Z Für Vitam-Ernährungsforschung J Int Vitaminol Nutr.* 2012 Dec;82(6):399–404.
53. Zittermann A, Ernst JB, Gummert JF, Börgermann J. Vitamin D supplementation, body weight and human serum 25-hydroxyvitamin D response: a systematic review. *Eur J Nutr.* 2014 Mar;53(2):367–74.
54. Kong J, Li YC. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 May;290(5):E916–924.

55. Ding C, Gao D, Wilding J, Trayhurn P, Bing C. Vitamin D signalling in adipose tissue. *Br J Nutr.* 2012 Dec 14;108(11):1915–23.
56. Shi H, Norman AW, Okamura WH, Sen A, Zemel MB. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2001 Dec;15(14):2751–3.
57. Mason C, Xiao L, Imayama I, Duggan C, Wang C-Y, Korde L, et al. Vitamin D3 supplementation during weight loss: a double-blind randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2014 May;99(5):1015–25.
58. Ortega RM, López-Sobaler AM, Aparicio A, Bermejo LM, Rodríguez-Rodríguez E, Perea JM, et al. Vitamin D status modification by two slightly hypocaloric diets in young overweight/obese women. *Int J Vitam Nutr Res Int Z Für Vitam- Ernährungsforschung J Int Vitaminol Nutr.* 2009 Mar;79(2):71–8.
59. Blum M, Dolnikowski G, Seyoum E, Harris SS, Booth SL, Peterson J, et al. Vitamin D(3) in fat tissue. *Endocrine.* 2008 Feb;33(1):90–4.

ARTICLE

Vitamin D3 supplementation does not influence serum Anti-Mullerian hormone levels in infertile vitamin D deficient women

¹Hélène Cappy, ²Paolo Giacobini, ³Pascal Pigny, ¹Maryse Leroy-Billiard, ¹Didier Dewailly, ^{1, 2}Sophie Catteau-Jonard

¹ Departments of Endocrine Gynaecology and Reproductive Medicine, Hôpital Jeanne de Flandre, C.H.R.U., Faculty of Medicine, Université de Lille II, 59037 Lille, France

² INSERM, Jean-Pierre Aubert Research Center, U837, Development and Plasticity of the Postnatal Brain, Lille, France

³ Department of biology and hormonology, C.H.R.U. Lille, 59037 Lille, France

ABSTRACT

BACKGROUND: Vitamin D deficiency is suspected to be involved in fertility impairment. Whether vitamin D acts on the ovarian function is still unclear. The involvement of vitamin D deficiency in Polycystic Ovaries Syndrome (PCOS) physiopathology has been suggested by some authors, through a role on glucose metabolism, ovulation disorder or obesity. Women with PCOS present high serum AMH levels, a marker of the ovarian reserve. A vitamin D response element has been identified in the promoter of the AMH gene and some *in vitro* studies suggested that calcitriol, the active form of vitamin D, is able to modulate the AMH gene expression.

METHODS: Serum AMH levels of vitamin D deficient infertile women was compared before and after treatment by vitamin D3 to investigate the potential influence of vitamin D supplementation on serum AMH levels. This analyze was performed according to women's ovarian status (PCOS and normal ovarian reserve [NOR]). The correlations between serum calciotropic hormones levels [25-hydroxyvitamin D (25(OH)D), 1,25 dihydroxyvitamin D(1,25(OH)₂D) , parathyroid hormone (PTH)] and serum AMH levels before and after treatment were studied.

RESULTS: 70 patients receiving a vitamin D3 supplementation were included: 30 patients with a normal weight (BMI<25kg/m²) and 40 overweight patients (BMI≥25kg/m²). In overweight women, baseline serum 25(OH)D levels were significantly lower than in normal weight women (p<0,05). No difference was found in serum AMH levels before and after supplementation in all the treated patients. Among the 70 patients, 27 had a normal ovarian reserve and 23 were diagnosed as PCOS. No difference on the serum AMH levels before and after treatment was found neither in PCOS patients nor in patients with NOR. Serum AMH levels were not correlated to serum 25(OH)D, serum 1,25(OH)₂D and serum PTH levels before and after treatment. Serum 25(OH)D levels before treatment were statistically lower in PCOS women than in NOR patients (p<0,05). Nevertheless, the difference did not remain significant after adjustment on the waist circumference.

CONCLUSION: The serum AMH levels do not seem to be linked to the vitamin D status and are not influenced by vitamin D3 supplementation in vitamin D deficient women. The vitamin D deficiency does not seem to be a feature of PCOS but rather linked to central obesity and insulin sensitivity.

Key-words: Anti-Müllerian Hormone, vitamin D, polycystic ovaries syndrome, infertility, insulin sensitivity

INTRODUCTION

Vitamin D deficiency is suspected to be involved in fertility impairment. Many authors hypothesized on the physiological role of this insufficiency: regulation trouble of ovarian hormones (oestradiol, progesterone), role in the immunity system in endometriosis or involvement in the physiopathology of polycystic ovaries syndrome (PCOS) (1). Some studies had also focused on the role of vitamin D on the glucose metabolism, with a potential negative effect of vitamin D deficiency on insulin sensitivity (1).

The vitamin D deficiency is frequent, especially in the Northern Europe. The active form of vitamin D is a steroid hormone, the $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (calcitriol) and is produced after hydroxylation by a 25-hydroxylase in the liver (carbon 25) and by the 1α -hydroxylase in the kidney (carbon 1). The vitamin D precursors are coming from diet after intestinal absorption or from sunlight-induced production in the skin (vitamin D₂, ergocalciferol and vitamin D₃, cholecalciferol) (2). The Vitamin D Receptor (VDR), has been identified in many tissues including bones, parathyroid glands, β -pancreatic cells, and reproductive cells like endometrial cells or granulosa cells of the ovary (1). The main identified role of vitamin D is the promotion of bone formation by increasing the calcium absorption in the intestine and balance the action of parathyroid hormone (PTH), the bone resorption hormone (3). The best indicator of the vitamin D status and reserve is represented by the serum 25 hydroxyvitamin D ($25(\text{OH})\text{D}$) levels. In fact, the concentrations of serum calcitriol levels are lower and more variable, due to a shorter half-life (4).

PCOS is the most common fertility endocrine disorder in female. This syndrome is characterized by a cycle trouble and clinical or biological hyperandrogenism and/or an ultrasound aspect of polycystic ovaries (increasing in the antral follicle count (AFC) and of the ovarian surface) (5). Another feature of this syndrome is the high serum AMH levels but the regulation of this AMH secretion remains still unclear.

A recent study highlighted the presence of a Vitamin D Response Element on the AMH promoter gene, which enhances the activity of the promoter after treatment by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, the active form of vitamin D (6). This opens the way to a new regulation point of the AMH gene. The involvement of vitamin D deficiency in the physiopathology of PCOS was the topic of many researches these last years. Especially, hypovitaminosis D was underlined by some authors through a role on glucose metabolism, obesity (7,8), or cycle and ovulation trouble (9).

Few studies focused on the effect of vitamin D supplementation on serum AMH levels. *Dennis et al.* found less seasonal variability of serum AMH levels in patients having a vitamin D supplementation but this study did not separate women according to their ovarian status (10). *Merhi et al.* found a correlation between circulating $25(\text{OH})\text{D}$ levels and serum AMH levels but only in women aged more than 40 years old (11).

The population of the Northern Europe is recognized to be at risk of vitamin D deficiency due to the lack of sunshine. That's why in our Reproductive medicine unit, infertile women benefit from a serum $25(\text{OH})\text{D}$ assay and in case of vitamin D deficiency, a supplementation according to the depth of their insufficiency. Furthermore, our population is at risk of vitamin D deficiency because of some

chronic disease (diabetes, auto-immune pathologies, obesity) and it is fundamental to balance the vitamin D level before and during the pregnancy for the fetus development, but also because vitamin D deficiency seems to be involved in obstetrical complications like pre-eclampsia or gestational diabetes mellitus (12,13,14).

To investigate whether AMH secretion is regulated by vitamin D, we compared serum AMH levels before and after vitamin D supplementation in a population of vitamin D deficient treated patients. Serum AMH level reflects the ovarian reserve and could be involved in PCOS physiopathology. So, we studied the influence of vitamin D supplementation in vitamin D deficient women with normal ovarian reserve and vitamin D deficient PCOS women to understand if there could be a variation according to the ovarian status. We performed analysis of serum 25(OH)D, serum 1,25(OH)₂D and serum PTH level before and after vitamin D treatment to analyze if the serum calciotropic hormones are correlated to serum AMH level.

MATERIALS AND METHODS :

Study population

The patients were all diagnosed and treated for infertility in the Reproductive Medicine Unit of the University Hospital of Lille (France). A hundred thirty-five women 18 to 43 years old were included consecutively in the Endocrine and Gynecology Unit during their infertility check-up performed between August and October 2013. The study was approved by the Institutional Review Board of the University Hospital of Lille. All patients gave their informed consent before inclusion in this study.

All the patients treated for infertility in the unit have a 25(OH)D assay and receive a supplementation corresponding to the depth of the deficiency according to guidelines (15) and a control of the 25(OH)D level after supplementation.

Vitamin D supplementation

The supplementation is standard (2, 3 or 4 vials of 100 000 IU per 15 days according to the depth of the insufficiency) or personalized in case of personal history (dose per days). Only the deficient patients having a standard supplementation were included. The vitamin D deficiency was defined as 25(OH)D < 30ng/ml (insufficiency for a 25(OH)D level between 20 and 29 ng/ml, deficiency between 10 and 19 ng/ml and deep deficiency for less than 10 ng/ml).

Depth of the deficiency	Standard supplementation with Cholecalciferol
Insufficiency: serum 25(OH)D level: 20-29 ng/ml	2 vials of 100 000 IU (1 per 15 days)
Deficiency: serum 25(OH)D level: 10-19 ng/ml	3 vials of 100 000 IU (1 per 15 days)
Deep deficiency: serum 25(OH)D level: 0-9 ng/ml	4 vials of 100 000 IU (1 per 15 days)

Were secondarily excluded from the study the women with a contraindication to a standard vitamin D supplementation (personal history of sarcoidosis, renal insufficiency, allergy to cholecalciferol), the women having an ongoing supplementation or receiving a vitamin D supplementation the previous 3 months.

Blood samples collection and serum analysis

The infertility check-up was performed between the second and the fifth day of the menstrual cycle. Clinical data were collected: personal and familiar history, regularity of the cycles, vitamin D intake the 3 previous months, weight, size and waist circumference measurement. To assess the ovarian status, serum hormonal assays were performed the same day as an ultrasound performing with an antral follicle count (AFC). The hormonal assays included serum FSH (ChemoLuminescence ImmunoAssay [CLIA]), serum LH (CLIA), serum oestradiol (CLIA), serum prolactin (CLIA), serum androgenes [17(OH)-progesterone (Radioimmunologic assay [RIA]), SDHEA (CLIA), Androstenedione (RIA), total testosterone (RIA)]. AMH was measured with MIS/AMH ELISA (Immunotech[®], *Beckman Coulter*, France). All included women had AMH levels above the sensitivity of the ELISA kit.

Serum 25(OH)D level was measured with a LIAISON® 25(OH)vitamin D total assay (*DiaSorin*, ChemoLuminescence ImmunoAssay). Serum parathyroid hormone (PTH) assay and serum 1,25(OH)₂D assay were measured with a CLIA.

During a medical consultation two to three months after the infertility workup, the efficiency of the supplementation was checked with a serum 25(OH)D assay, and serum 1,25(OH)₂D, serum PTH and serum AMH assays were performed. The observance of the treatment was controlled by a questionnaire during the consultation.

Characterization of the ovarian status

The infertility workup allowed the characterization of the ovarian status for each patient: normal ovarian reserve (NOR), low ovarian reserve (LOR), polycystic ovaries syndrome (PCOS) or asymptomatic polycystic ovaries (APCO).

The diagnosis of PCOS was defined on ESHRE/ASRM criteria (5) with actualization of the AFC and AMH threshold according to the standards established by *Dewailly et al* (16) (Rotterdam consensus criteria: presence of any two of the following three components: 1) oligo-anovulation and/or 2) clinical or biochemical evidence of hyperandrogenemia and/or 3) polycystic ovaries on ultrasound after exclusion of other causes of hyperandrogenism). The low ovarian reserve was diagnosed in women with less than 16 follicles for both ovaries and a serum AMH level below 10pmol/l.

The women with premature ovarian failure (serum AMH level non measurable) was excluded of the study.

Statistical analysis

Subject group characteristics were compared using the non-parametric Mann–Whitney test for non-normally distributed data. Serum AMH level before and after supplementation in each groups were compared using the Wilcoxon signed rank test. Spearman correlation coefficients were calculated between serum AMH level, serum 25(OH)D level, serum 1,25(OH)₂D level, serum PTH level, weight, BMI (Body Mass Index), waist circumference and age. A one-way ANOVA test was used to analyze the difference in serum 25(OH)D levels between PCOS patients and NOR patients with adjustment for the BMI, the age, the serum AMH level and the waist measurement. Data were analysed using *IBM* SPSS 22 statistics software. The limit of statistical significance was set at $p < 0.05$. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD).

RESULTS :

Between August and October 2013, 135 patients had an infertility work-up in the unit. Among these 135 patients, 124 (91%) had a 25(OH)D insufficiency (25(OH)D level <30ng/ml) (Fig.1) and 113 were eligible for vitamin D supplementation. Forty-three patients were secondarily excluded. Seventy patients were finally included and had a control of serum 25(OH)D, 1,25(OH)₂D, PTH and AMH level (See flow chart in Fig. 2).

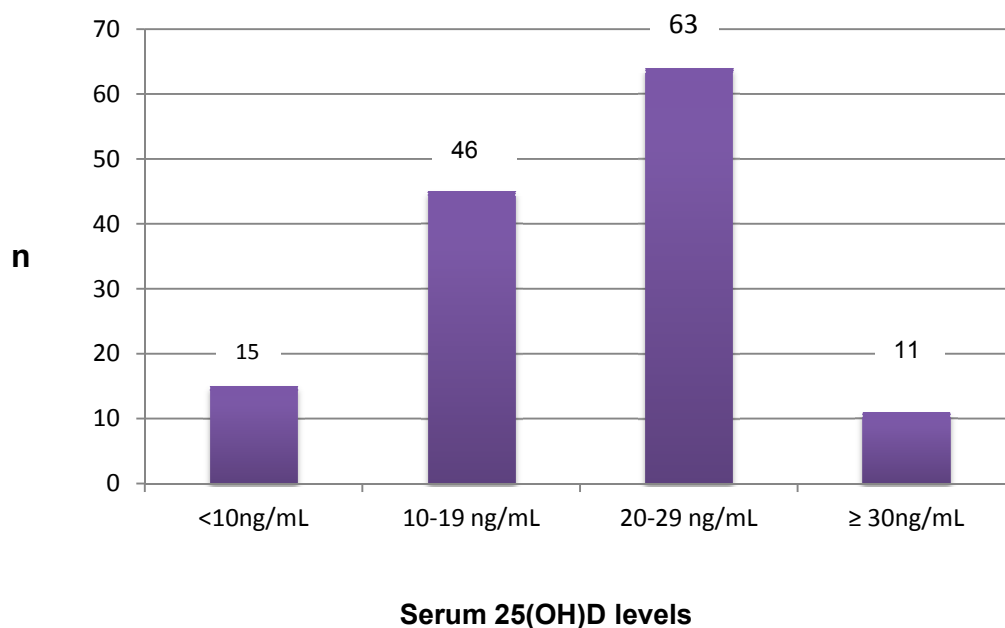
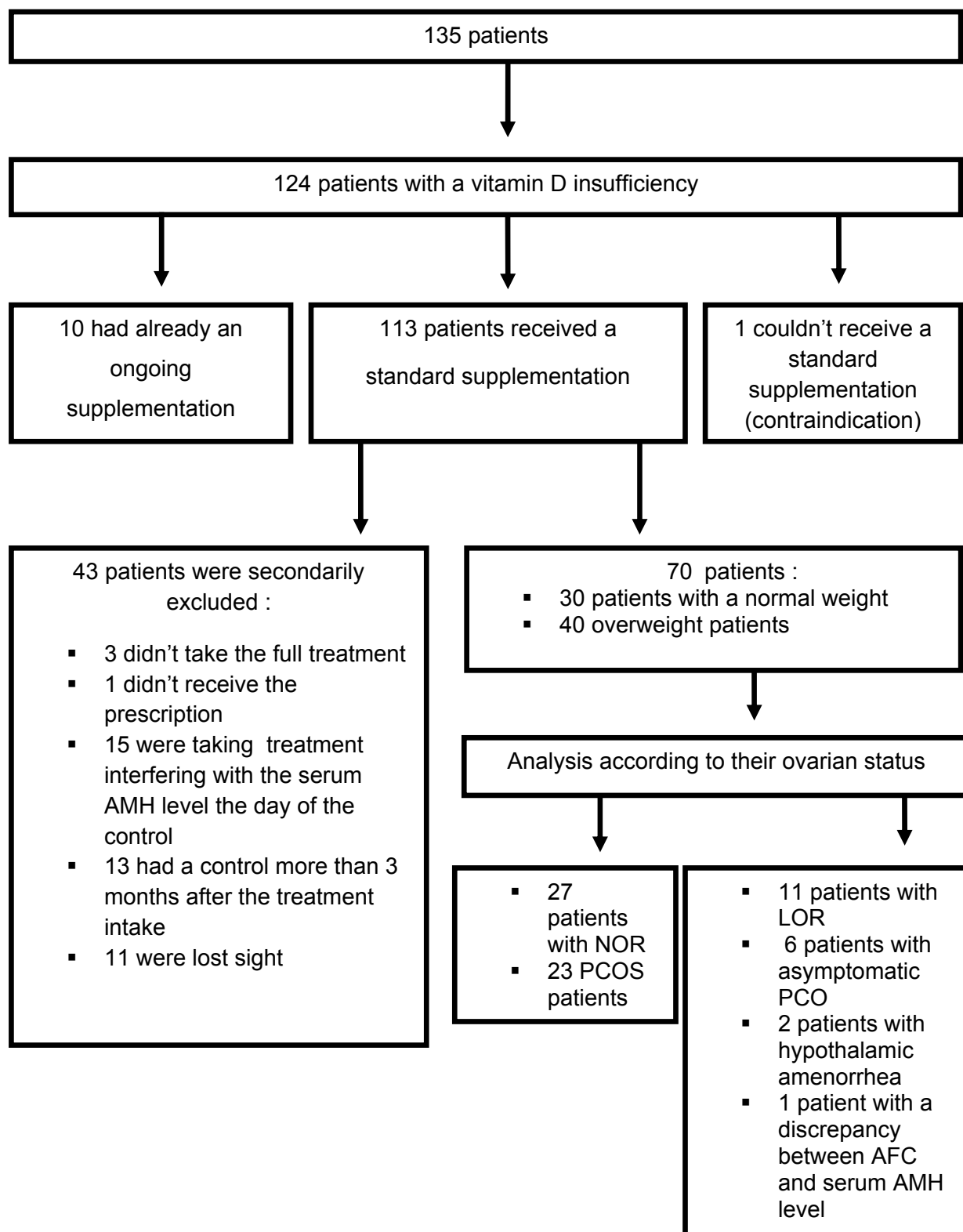


Figure 1: Vitamin D status in the full population



NOR: Normal Ovarian Reserve ; LOR: Low Ovarian Reserve ; PCOS: Polycystic Ovaries Syndrome ; PCO: Polycystic Ovaries

Figure 2: Flow chart of the study population

Within this population (n=70), the serum 25(OH)D levels before treatment were statistically lower in the overweight patients (BMI ≥ 25 kg/m² ;n=40) compared to the normal weight patients (BMI <25 kg/m² ;n=30) (Table 1). Baseline serum 25(OH)D levels were not correlated to the BMI in our population (n=70; p=0,282; r=-0,130) but had a strong tendency to be correlated with the waist circumference (n=70; p=0,073; r=-0,219).

Baseline serum PTH levels were statistically higher in overweight patients (n=40) compared to normal weight patients (n=30). Baseline serum PTH levels were positively correlated to the BMI (n=70; p=0,017; r=0,287) and the waist circumference (n=70; p=0,023; r=0,278).

So baseline serum 25(OH)D and serum PTH levels seemed to be linked to the weight status. Baseline serum AMH levels were not significantly different in normal weight women compared to overweight women (Table1).

	Study population (n=70)	Normal weight patients [BMI <25 kg/m ²] (n=30)	Overweight patients [BMI ≥ 25 kg/m ²] (n=40)
Baseline serum 25(OH)D levels(ng/ml)	18,78 $\pm$ 6,40	21,10 $\pm$ 5,88 ^a	17,05 $\pm$ 6,29 ^a
Baseline serum PTH levels (pg/ml)	56,50 $\pm$ 26,91	46,65 $\pm$ 16,07 ^a	63,65 $\pm$ 30,86 ^a
Baseline serum AMH levels (pmol/l)	38,57 $\pm$ 46,12	41,87 $\pm$ 61,05	36,11 $\pm$ 31,26

The values are expressed in mean $\pm$ SD

^a Mann-Whitney test: p <0,05 between normal weight and overweight patients

Table 1: Baseline serum 25(OH)D, PTH and AMH levels in the study population and according to the weight status

Vitamin D supplementation had no effect on serum AMH levels. After supplementation in vitamin D3, the serum AMH levels were not statistically different of the baseline serum AMH level either in the population of the 70 treated patients ($p=0,427$) or specifically according to the patients' weight (table 2).

Population	n	AMH before supplementation (mean $\pm$ SD)	AMH after supplementation (mean $\pm$ SD)	p
All	70	38,2 $\pm$ 46,1	38,9 $\pm$ 43,5	0,427
Normal weight patients	30	41,68 $\pm$ 61,08	42,29 $\pm$ 53,10	0,424
Overweight patients	40	35,63 $\pm$ 31,24	36,52 $\pm$ 35,06	0,748
Patients having partial or total correction of vitamin D insufficiency	59	35,73 $\pm$ 27,32	36,66 $\pm$ 30,82	0,659
PCOS patients	23	71,7 $\pm$ 67,5	68,5 $\pm$ 62,6	0,287
NOR patients	27	21,5 $\pm$ 7,5	23,8 $\pm$ 11,3	0,209

p :degree of significance with the Wilcoxon test

Table 2: Difference between serum AMH levels before and after supplementation in the different groups

There was no correlation between serum 25(OH)D levels and serum AMH levels before and after supplementation (respectively $p=0,425$; $r= 0,097$ and $p=0,824$; $r=0,270$). No correlation was found between serum 1,25(OH)₂D levels, serum PTH levels and serum AMH levels before treatment (respectively $p=0,364$; $r=0,111$ and

$p=0,272$; $r=-0,134$) and after treatment (respectively $p=0,126$; $r=0,188$ and $p=0,536$; $r=-0,076$).

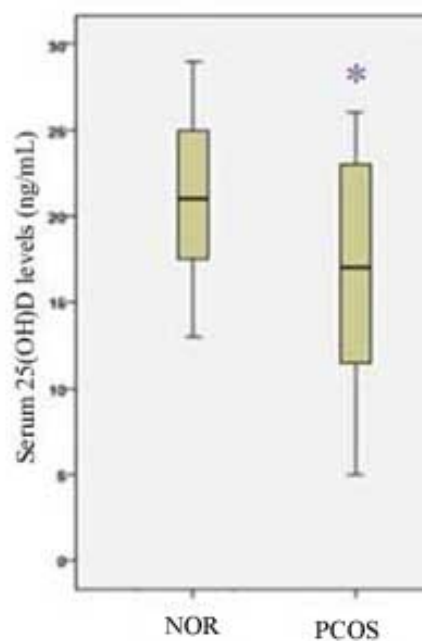
To determine if the standard supplementation was less efficient in overweight patients, we analyzed the magnitude of variation of 25(OH)D levels before and after supplementation between patients with normal weight and overweight patients. No difference was found ($p=0,103$). After restriction of the analysis only to the patients who corrected totally or partially the insufficiency ($n=59$), no significant difference in serum AMH levels before and after treatment was found ($p=0,659$).

To investigate if the effect of vitamin D supplementation on serum AMH levels could be influenced by the ovarian status, the patients included were classified according their ovarian reserve: 27 had a normal ovarian reserve [NOR] and 23 had a PCOS. (See flow chart fig. 2)

No difference was found in serum AMH levels before and after supplementation neither in PCOS patients nor in patients with NOR (table 2). No significant correlation between serum calciotropic hormones (25(OH)D, 1,25(OH)₂D and PTH) and serum AMH levels was found in PCOS patients and patients with normal ovarian reserve.

Baseline serum 25(OH)D levels were statistically lower in PCOS patients ($n=23$) compared to the patients with a normal ovarian reserve ($n=27$) ($p<0,05$) (fig. 3). No difference was found between baseline serum PTH levels in PCOS patients compared to NOR patients ($p=0,810$). The BMI and the waist circumference were not statistically different between these two groups (table 3). The patients were statistically younger in the PCOS group ($p<0,05$) but the serum 25(OH)D level was not correlate with the age of the patients ($p=0,924$; $r=-0,012$). After adjustment for BMI, age and serum AMH levels, the variance analysis for baseline serum 25(OH)D

level by ovarian status (PCOS versus NOR patients) remained statistically significant (respectively $p=0,048$, $p=0,015$ and $p=0,013$), meaning that these variables were not involved in the difference of baseline serum 25(OH)D levels between PCOS and NOR patients. On the contrary, after adjustment for the waist circumference, the variance analysis was not statistically significant ($p=0,103$). So, the lower baseline serum 25(OH)D levels in PCOS women seemed to be linked to the waist circumference. In these two groups, the serum 25(OH)D levels had a strong tendency to be correlated with the waist circumference ($p=0,054$; $r=-0,280$) but not with the BMI ($p=0,143$; $r=-0,210$).



* $p<0,05$ (Mann-Whitney test)

Figure 3 : Representation of the baseline serum 25(OH)D levels distribution in PCOS patients and in NOR patients

	All treated patients (n=70)		Patients treated with NOR (n=27)		PCOS treated patients (n=23)	
Age (years)	30,2 ± 5,1		30,8 ± 5,4 ^a		27,1 ± 4,4 ^a	
BMI (kg/m²)	28,3 ± 7,1		28,2 ± 6,1		29,3 ± 6,7	
Waist circumference (cm)	84,1 ± 16,15		83,1 ± 15,6		88,04 ± 15,02	
	before treatment	after treatment	before treatment	after treatment	before treatment	after treatment
Serum 25(OH)D (ng/ml)	18,7 ± 6,4	33,1 ± 9,4 ^c	20,7 ± 5,4 ^a	31,1 ± 8,5 ^c	17,1 ± 6,5 ^a	32,0 ± 9,2 ^c
Serum AMH (pmol/l)	38,2 ± 46,1	38,9 ± 43,5	21,5 ± 7,5 ^a	23,8 ± 11,3 ^a	71,7 ± 67,5 ^a	68,5 ± 62,6 ^a

The values are expressed in mean ± SD

^a Mann-Whitney test : p value <0,05 between NOR and PCOS patients

^b Wilcoxon test value : p value <0,05 between serum AMH level before and after supplementation

^c Wilcoxon test value: p value <0,05 between serum 25(OH)D level before and after supplementation

Table 3: Characteristics of NOR and PCOS patients and serum 25(OH)D and AMH levels before and after supplementation.

DISCUSSION

To investigate whether the vitamin D deficiency is involved in the regulation of AMH secretion, we looked at the serum AMH level of vitamin D deficient patients that were treated in the unit for infertility, before and after supplementation. No difference in the serum AMH levels before and after treatment was found. The serum AMH level was not correlated either with serum 25(OH)D level or with the other calciotropic hormones (1,25(OH)₂D and PTH).

Our findings are in contrast with the study of *Dennis et al.*(10), who found that 25(OH)D status influence the serum AMH level. They gave daily supplements of 1000 IU of vitamin D3 (n=16) or a placebo (n=10). They found a seasonal variation either in serum 25(OH)D and in serum AMH level in the patients receiving a placebo, with winter serum AMH levels 18% lower than the summer one's. The daily supplementation with vitamin D3 prevented the serum 25(OH)D and serum AMH seasonal loss. The magnitude of variation of 25(OH)D level was correlated with the magnitude of variation of AMH level.

However, our study population included a greater number of patients (n=70) and we could differentiate for the first time the influence of the vitamin D supplementation on serum AMH level in PCOS patients (n=23) and in patients with normal ovarian reserve (n=27) . We hypothesized that the effect of vitamin D supplementation on serum AMH levels could be influenced by the ovarian status of the patient. In fact, PCOS patients exhibited lower baseline serum 25(OH)D levels than patients with NOR ($p<0,05$). However, no difference was found in serum AMH levels before and after supplementation in these two groups and no correlation was found between serum 25(OH)D levels and serum AMH levels.

Merhi et al. (11) found a positive and significant relationship between the baseline serum 25(OH)D level and the serum AMH level in women aged ≥ 40 years in a population of 141 patients. For younger women, the correlation did not reach the significance. Our population of 40 years old and above represented only 3 patients and wasn't so enough statistically powerful. Anyway, serum AMH levels are mostly very low and non measurable after 40 years old so further investigations are needed to corroborate these results.

Concerning the *in vitro* studies treating cell culture with vitamin D3 and looking at the AMH gene expression, the results are heterogenous. *Wojtusik and Johnson* (17) treated primary culture of hen granulosa cells coming from antral follicles with different concentration of 1,25(OH)₂D₃ (0, 10nM, 100nM) and studied the AMH gene expression by quantitative PCR. The expression of AMH mRNA was dose-related decreasing in response to vitamin D ($p < 0,05$). *Malloy et al.* (6) analysed the AMH promoter and found a putative VDRE in the AMH gene promoter sequence. They investigated the regulation of the AMH promoter activity by 1,25(OH)₂D₃ in a human cancer cell line, HeLa cells. After transfection of the human AMH promoter in HeLa cells, they demonstrated that calcitriol treatment (at 0, 1, 10, 100 nM) induce a dose-dependent response of the AMH promoter activity (6). However, the concentration of calcitriol used in these studies (1 to 100nM) to treat directly the cell cultures represent 10 to 1000 more than the concentration of the 1,25(OH)₂D₃ that is measurable in the human blood (serum 1,25(OH)₂D₃ normal range: 40-140 pmol/l) or in the human follicular fluid (order of magnitude: 50 pmol/l in the study of *Potashnik et al.* [18]). So the relevance of these *in vitro* experiments in the human physiology is still unclear and that's maybe why we didn't found any significant variation in the serum AMH level *in vivo* after vitamin D3 treatment.

In our population, baseline serum PTH levels were statistically higher in overweight women compared to normal weight women ($p < 0,05$). Baseline serum PTH levels were correlated to the BMI ($p = 0,017$) and the waist circumference ($p = 0,023$). No difference was found between PCOS patients and patients with NOR in the serum PTH levels. In the literature, *Panidis et al.* (19) reported that serum PTH concentrations are increased in obese women and women with PCOS-associated hyperandrogenism independently of the BMI. *Mahmoudi et al.* (20) showed elevated serum PTH levels in normal weight PCOS women, and a positive correlation between serum PTH levels and insulin levels and insulin resistance. The high serum PTH levels noticed in PCOS women seem to be linked to the weight more than the PCOS itself.

Some authors reported low 25(OH)D levels in PCOS women and women with central obesity (7,21,22,23). Serum 25(OH)D levels are lower in obese control women than lean PCOS women (24) and the low 25(OH)D levels seem to be associated with the metabolic syndrome in PCOS patients (22).

In our study, baseline serum 25(OH)D levels in PCOS patients were significantly lower than in patients with NOR. This difference did not remain significant after adjustment for the waist circumference but remained significant after adjustment for the BMI. Even if the difference of waist circumference between the two groups did not reach the significance, these data suggests that the lower serum 25(OH)D levels in PCOS women seem to be explained by the central obesity and the degree of adiposity more than by the BMI alone. Waist measurement is an accurate anthropometric method to estimate central obesity and so a marker of insulin resistance (25). PCOS women presents a decrease in insulin sensitivity and hyperinsulinemia, greater than can be explained by obesity alone (26,27,28). It is

known that PCOS women have an increased in central fat (29), and it is associated with the insulin sensitivity trouble in this syndrome. The low serum 25(OH)D levels underlined by some studies in PCOS women are probably due to the increase in central adiposity in this pathology and does not seem to be a feature of PCOS itself.

Whether hypovitaminosis D is the cause or the consequence of obesity remains still unclear. In our population, baseline serum 25(OH)D levels were lower in overweight patients compared to normal weight patients ($p < 0,05$). The recent review of *Cândido and Bressan* (3) highlighted the various possible mechanisms of action of vitamin D on adipocytes by regulation of adipogenesis and on β -pancreatic cells by stimulation of insulin synthesis but the relationship between low serum 25(OH)D levels, obesity and type 2 diabetes is not well established. Vitamin D3 has also been measured in fat tissue of morbidly obese subjects with suboptimal vitamin D status (< 30 ng/ml) and positively correlated to serum 25(OH)D levels, so fat tissue could be a storage reservoir of vitamin D (30).

One limit of our study is that the serum AMH level control after treatment was not performed at the beginning of the menstrual cycle like the first was. Some serum AMH variation across the menstrual cycle was reported by some authors (31). Secondly, the standard supplementation was not adapted on the patient weight. In fact, patient with severe obesity would have probably needed higher dose of vitamin D3 treatment. However, no difference was found in the magnitude of variation of the serum 25(OH)D levels before and after treatment between overweight patients and normal weight patients. Then, we controlled the serum 25(OH)D level the same day as the serum AMH level assay to check the efficiency of the supplementation for whatever weight.

CONCLUSION

Vitamin D3 supplementation in infertile vitamin D deficient women did not have any influence on serum AMH levels. Serum 25(OH)D levels and other serum calciotropic hormones were not correlated to serum AMH levels. In our study, there was no influence of vitamin D supplementation on serum AMH levels in PCOS women. The low serum 25(OH)D levels already previously reported in PCOS women seem to be linked to central obesity and insulin sensitivity and not to the ovarian status. However, the clear role of vitamin D on glucose metabolism is still unknown.

The potential influence of vitamin D on the ovarian function remains still unclear but the normalization of serum vitamin D levels does not seem to act directly on serum AMH levels.

BIBLIOGRAPHY REFERENCES

1. Anagnostis P, Karras S, Goulis DG. Vitamin D in human reproduction: a narrative review. *Int J Clin Pract*. 2013;67(3):225–35.
2. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266–81.
3. Cândido FG, Bressan J. Vitamin D: Link between Osteoporosis, Obesity, and Diabetes? *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):6569–91.
4. Hanley DA, Cranney A, Jones G, Whiting SJ, Leslie WD, Guidelines Committee of the Scientific Advisory Council of Osteoporosis Canada. Vitamin D in adult health and disease: a review and guideline statement from Osteoporosis Canada (summary). *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can*. 2010;182(12):1315–9.
5. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod Oxf Engl*. 2004 ;19(1):41–7.
6. Malloy PJ, Peng L, Wang J, Feldman D. Interaction of the vitamin D receptor with a vitamin D response element in the Mullerian-inhibiting substance (MIS) promoter: regulation of MIS expression by calcitriol in prostate cancer cells. *Endocrinology*. 2009 ;150(4):1580–7.
7. Hahn S, Haselhorst U, Tan S, Quadbeck B, Schmidt M, Roesler S, et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with insulin resistance and obesity in women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc*. 2006;114(10):577–83.
8. Kotsa K, Yavropoulou MP, Anastasiou O, Yovos JG. Role of vitamin D treatment in glucose metabolism in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2009;92(3):1053–8.
9. Thys-Jacobs S, Donovan D, Papadopoulos A, Sarrel P, Bilezikian JP. Vitamin D and calcium dysregulation in the polycystic ovarian syndrome. *Steroids*. 1999;64(6):430–5.
10. 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;97(7):2450–5.
11. 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;98(1):228–34.
12. Lewis S, Lucas RM, Halliday J, Ponsonby A-L. Vitamin D deficiency and pregnancy: from preconception to birth. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(8):1092–102.
13. Tabesh M, Salehi-Abargouei A, Tabesh M, Esmailzadeh A. Maternal vitamin D status and risk of pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(8):3165–73.
14. Poel YHM, Hummel P, Lips P, Stam F, van der Ploeg T, Simsek S. Vitamin D and gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Intern Med*. 2012;23(5):465–9.

15. Benhamou C-L, Souberbielle J-C, Cortet B, Fardellone P, Gauvain J-B, Thomas T. Vitamin D in adults: GRIO guidelines. *Presse Med.* 2011;40: 673–682.
16. Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, et al. Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2011;26(11):3123–9.
17. Wojtusik J, Johnson PA. Vitamin D regulates anti-Mullerian hormone expression in granulosa cells of the hen. *Biol Reprod.* 2012;86(3):91.
18. 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;7(10):1357–60.
19. Panidis D, Balaris C, Farmakiotis D, Rousso D, Kourtis A, Balaris V, et al. Serum parathyroid hormone concentrations are increased in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Chem.* 2005;51(9):1691–7.
20. Mahmoudi T, Gourabi H, Ashrafi M, Yazdi RS, Ezabadi Z. Calcitropic hormones, insulin resistance, and the polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2010;93(4):1208–14.
21. Yildizhan R, Kurdoglu M, Adali E, Kolusari A, Yildizhan B, Sahin HG, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2009;280(4):559–63.
22. Wehr E, Pilz S, Schweighofer N, Giuliani A, Kopera D, Pieber TR, et al. Association of hypovitaminosis D with metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc.* 2009;161(4):575–82.
23. Muscogiuri G, Policola C, Prioletta A, Sorice G, Mezza T, Lassandro A, et al. Low levels of 25(OH)D and insulin-resistance: 2 unrelated features or a cause-effect in PCOS? *Clin Nutr Edinb Scotl.* 2012;31(4):476–80.
24. Tsakova AD, Gateva AT, Kamenov ZA. 25(OH) vitamin D levels in premenopausal women with polycystic ovary syndrome and/or obesity. *Int J Vitam Nutr Res Int Z Für Vitam- Ernährungsforschung J Int Vitaminol Nutr.* 2012;82(6):399–404.
25. Toscani M, Migliavacca R, Sisson de Castro JA, Spritzer PM. Estimation of truncal adiposity using waist circumference or the sum of trunk skinfolds: a pilot study for insulin resistance screening in hirsute patients with or without polycystic ovary syndrome. *Metabolism.* 2007;56(7):992–7.
26. Rajkhowa M, Bicknell J, Jones M, Clayton RN. Insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome: relationship to hyperandrogenemia. *Fertil Steril.* 1994;61(4):605–12.
27. Gullet H, Hecart AC, Delemer B, Gross A, Sulmont V, Leutenegger M, et al. Roles of LH and insulin resistance in lean and obese polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1993;38(6):621–6.
28. Dunaif A, Finegood DT. Beta-cell dysfunction independent of obesity and glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(3):942–7.

29. Puder JJ, Varga S, Kraenzlin M, De Geyter C, Keller U, Müller B. Central fat excess in polycystic ovary syndrome: relation to low-grade inflammation and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(11):6014–21.
30. Blum M, Dolnikowski G, Seyoum E, Harris SS, Booth SL, Peterson J, et al. Vitamin D(3) in fat tissue. *Endocrine.* 2008;33(1):90–4.
31. Hadlow N, Longhurst K, McClements A, Natalwala J, Brown SJ, Matson PL. Variation in antimüllerian hormone concentration during the menstrual cycle may change the clinical classification of the ovarian response. *Fertil Steril.* 2013;99(6):1791–7.

CONCLUSION

La normalisation des taux sériques de vitamine D chez des patientes infertiles carencées ne semble pas influencer les taux d'AMH sériques. Aucune corrélation n'a été retrouvée entre les taux sériques de 25(OH)D, de 1,25(OH)₂D, de PTH et d'AMH sériques avant et après supplémentation en vitamine D3. Les taux de 25(OH)D sériques étaient statistiquement plus bas chez les patientes en surpoids en comparaison aux patientes de poids normal dans la population étudiée.

En analysant plus spécifiquement les taux de 25(OH)D sériques chez les patientes en fonction de leur statut ovarien, nous avons retrouvé des taux statistiquement plus bas chez les patients présentant un SOPK en comparaison aux patientes avec réserve ovarienne normale. Cette différence persistait après ajustement sur l'âge, l'indice de masse corporelle et les taux d'AMH sériques. Par contre, cette différence n'était plus significative après ajustement sur le tour de taille. Les taux de vitamine D bas chez les patientes présentant un SOPK ne semblent donc pas être une caractéristique de la pathologie en elle-même, mais liés à l'excès de graisse abdominale. En effet, l'obésité abdominale est fréquemment associée un hyperinsulinisme et à une baisse de l'insulino-sensibilité et les taux bas de vitamine D déjà rapportés chez les patientes présentant un SOPK sont probablement liés à l'excès de graisse abdominale fréquente dans ce syndrome.

Le rôle de la vitamine D dans la physiologie ovarienne reste méconnu. L'influence directe de l'augmentation des taux sériques de vitamine D sur la sécrétion globale d'AMH, reflétée par son taux circulant, n'a pas été retrouvée dans cette étude. La

présence du récepteur de la vitamine D au niveau de la cellule de granulosa et de l'élément de réponse à la vitamine D sur le promoteur du gène de l'AMH laisse penser qu'une régulation intra-ovarienne de la cellule de granulosa par la vitamine D est possible, mais cela reste à démontrer. En collaboration avec l'unité INSERM U837 (équipe 2), des travaux de recherche *in vitro* sont en cours : l'objectif est de déterminer si le traitement par des doses croissantes de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de cultures primaires de cellules de granulosa humaines (extraites à partir de liquide folliculaire issu de ponctions ovariennes chez patientes traitées en FIV) influence l'expression du gène de l'AMH (étude des transcrits du gène de l'AMH en PCR temps réel).

La supplémentation en vitamine D ne semble pas faire partie de la stratégie thérapeutique du syndrome des ovaires polymicrokystiques, mais reste fondamentale dans les régions à faible ensoleillement en raison de la prévalence élevée de l'insuffisance vitaminique.

AUTEUR : CAPPY Hélène

Date de Soutenance : 16 juin 2014

Titre de la Thèse : Influence de la supplémentation en vitamine D chez des patientes carencées sur les taux sériques d'hormone anti-Müllérienne

Thèse - Médecine - Lille 2014

Cadre de classement : Gynécologie Endocrinienne et Médecine de la reproduction

DES + spécialité : DES Gynécologie Médicale

Mots-clés : hormone anti-Müllérienne, vitamine D, syndrome des ovaires polymicrokystiques, infertilité, insulino-sensibilité

Résumé :

Titre de la Thèse : Influence de la supplémentation en vitamine D chez des patientes carencées sur les taux sériques d'hormone anti-Müllérienne

Contexte: La carence en vitamine D est suspectée d'être impliquée dans les troubles de la fertilité. L'action de la vitamine D sur la fonction ovarienne est peu claire. L'implication de la vitamine D dans le syndrome des ovaires polymicrokystiques (SOPK) a été suggérée avec un rôle potentiel dans la dysovulation, les troubles du métabolisme glucidique ou dans l'obésité. Un élément de réponse à la vitamine D a été retrouvé *in vitro* sur le promoteur du gène de l'hormone anti-Müllérienne (AMH), hormone dont les taux sériques sont élevés dans le SOPK.

Méthode : Les taux d'AMH sériques de femmes infertiles carencées en vitamine D ont été comparés avant et après supplémentation en vitamine D3, afin d'évaluer l'influence de la supplémentation sur les taux d'AMH sériques. L'analyse a également été réalisée selon le statut ovarien des patientes (SOPK et réserve ovarienne normale). Les corrélations entre les taux sériques d'hormones calcitropes [25-hydroxyvitamine D (25(OH)D), 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25(OH)₂D), parathormone (PTH)] et les taux d'AMH sériques avant et après traitement ont été étudiés.

Résultats : 70 patientes recevant une supplémentation en vitamine D3 ont été incluses : 30 patientes avaient un poids normal (IMC<25kg/m²) et 40 étaient en surpoids (IMC≥25 kg/m²). Chez les patientes en surpoids, le taux de base en 25(OH)D sérique était significativement plus bas que chez les patientes de poids normal (p<0,05). Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les taux d'AMH sériques avant et après supplémentation en vitamine D3 chez toutes les patientes traitées. Parmi les 70 patientes, 27 avaient une réserve ovarienne normale et 23 présentaient un SOPK. Aucune différence entre les taux sériques d'AMH avant et après traitement n'a été retrouvée chez les patientes SOPK comme chez les patientes à réserve ovarienne normale. Les taux d'AMH sériques n'étaient pas corrélés aux taux des hormones calcitropes (25(OH)D, 1,25(OH)₂D et PTH) avant et après traitement. Les taux sériques de base de 25(OH)D étaient statistiquement plus bas chez les patientes avec SOPK en comparaison aux patientes avec réserve ovarienne normale (p<0,05). Cependant cette différence n'était plus significative après ajustement sur le tour de taille.

Conclusion : Les taux sériques d'AMH ne semblent pas liés au statut en vitamine D et ne sont pas influencés par la supplémentation en vitamine D3 chez les patientes carencées. La carence en vitamine D ne semble pas être une caractéristique du SOPK, mais en relation avec l'excès de graisse abdominale fréquente dans ce syndrome et liée à l'insulino-sensibilité.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Pr Didier DEWAILLY

Assesseurs : Monsieur le Professeur Pascal PIGNY

Monsieur le Docteur Vincent PREVOT

Madame le Docteur Maryse LEROY-BILLIARD

Directeur : Madame le Docteur Sophie JONARD-CATTEAU