

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

ANNÉE 2015

N° 063

THÈSE

POUR LE

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
(DES DE GYNÉCOLOGIE MÉDICALE)

PAR ÉLISE GORISSE
NÉE LE 20/12/1986 À LILLE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE *09 AVRIL 2015*

**ÉVALUATION COMPARATIVE ET CRITIQUE
DES NOUVELLES TECHNIQUES DE DOSAGE
DE L'HORMONE ANTI-MÜLLERIENNE
ET DE LA DELTA 4 ANDROSTENÉDIONE
POUR LE DIAGNOSTIC
DU SYNDROME DES OVAIRES POLYKYSTIQUES**

PRÉSIDENT DU JURY : MONSIEUR LE PROFESSEUR PAUL BARRIERE
DIRECTEUR DE THÈSE : MONSIEUR LE PROFESSEUR DIDIER DEWAILLY
MEMBRES DU JURY : MONSIEUR LE PROFESSEUR DAMIEN MASSON
MADAME LE DOCTEUR FABIENNE DELAY

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Paul BARRIERE,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce Jury de Thèse.

Je vous remercie pour votre disponibilité tout au long de l'internat. Soyez assuré de mon profond respect pour votre travail et vos compétences dans le service de médecine de la reproduction du CHU de Nantes.

A Monsieur le Professeur Didier DEWAILLY, Directeur de Thèse,

Qui a accepté de m'accompagner pendant toute la durée de ce travail initié à Lille.

Je vous remercie pour votre accueil dans votre équipe du service de gynécologie endocrinienne au CHRU de Lille pendant mon semestre d'inter-CHU ainsi que pour votre précieuse aide pour la rédaction des deux articles scientifiques.

Soyez assuré de ma reconnaissance pour votre déplacement à Nantes ce 09 avril 2015.

A Monsieur le Professeur Damien MASSON,

Qui m'a fait l'honneur d'évaluer cette Thèse.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur Fabienne DELAY,

Pour sa présence dans ce Jury et son accompagnement.

Je te remercie pour ton soutien et ta disponibilité pendant les différents semestres passés ensemble. Merci pour ton perfectionnisme mais aussi ta joie de vivre! Sois assurée de ma sincère estime.

A Monsieur le Professeur Pascal PIGNY pour son aide et sa disponibilité au sein du laboratoire d'hormonologie du CHRU de Lille.

A Monsieur le Professeur Alain DUHAMEL pour la réalisation de l'analyse statistique de cluster.

A Messieurs les Docteurs Amjad GHULAM et Bodalé DJOBO,

Pour la réalisation des dosages de delta 4 androstènedione et leur disponibilité pendant ce travail.

A Monsieur le Docteur Guillaume DUCARME,

Pour avoir eu confiance en moi pendant ces deux semestres passés au CHD de la Roche sur Yon. C'est un réel plaisir de travailler au sein de votre équipe de soignants. Soyez assuré de ma reconnaissance.

Aux équipes médicales et paramédicales des services de médecine de la reproduction et de SIG/DAN au CHU de Nantes, de Procréalis et de gynécologie obstétrique au CHD de la Roche Sur Yon, des maternités de Saint Nazaire et de Châteaubriant.

A l'équipe de PMA et de l'hôpital de jour de Jeanne de Flandres de Lille.

A mes parents, pour tout le soutien et la confiance que vous me donnez chaque jour.

Merci infiniment!

A Sophie et Xavier, merci d'être là pour moi malgré la distance qui nous sépare.

A Cyriac et Simon mes frangins qui ont su forgé mon caractère ! A Emilie ma belle-sœur que j'apprécie particulièrement.

A mes grands-parents et à tous les membres de notre grande famille du nord avec qui je passe des moments extras ! Merci !

A Olivier, pour m'avoir soutenu pendant ces quatre années d'internat. Je te remercie particulièrement pour tes attentions au quotidien et tes conseils judicieux.

A Madeleine, Claude, Jeanne et Victor qui m'ont accueilli chaleureusement dans la « belle famille ».

A Pauline, Flo, Perrine, Aude, Alice, Marie-aude et Vanessa mes amies fidèles de longue date.

A Laurianne, ma super coloc' de Châteaubriant, pour ses conseils pertinents.

A Aimée et Adrienne, la fine équipe de biogirls !

A tous mes autres co-internes et amis que j'ai pu rencontrer depuis le début de l'internat, particulièrement Tiphaine pour son soutien à tout point de vue en tant que collègue et amie.

TABLE DES MATIERES

1. ABREVIATIONS	7
2. INTRODUCTION.....	8
LE SYNDROME DES OVAIRES POLYKYSTIQUES	8
L'HORMONE ANTI-MÜLLERIENNE	11
Généralités.....	11
Techniques de dosage.....	13
L'HYPERANDROGENIE	15
Généralités.....	15
La stéroïdogénèse ovarienne	16
Définition clinique.....	18
Définition biologique	19
LA DELTA 4 ANDROSTENEDIONE ET SON DOSAGE.	20
La technique de radio-immunodosage	20
La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem	21
3. OBJECTIFS	23
4. ARTICLE 1: COMPARAISON DES TECHNIQUES DE DOSAGE DE L'AMH : EIA AMH/MIS, GEN II ET AL-105i POUR LE DIAGNOSTIC DU SYNDROME DES OVAIRES POLYKYSTIQUES.	24
INTRODUCTION.....	25
MATERIELS ET METHODES.....	26
RESULTATS	29
DISCUSSION.....	31
CONCLUSION.....	33
REFERENCES	35
ANNEXES	37
Table 1.....	37
Table 2.....	38
Table 3.....	39
Table 4.....	40
Figure 1	41
Figure 2	42
5. ARTICLE 2: DOSAGE DE LA DELTA 4 ANDROSTENEDIONE AVEC LC-MS/MS: COMPARAISON AVEC RIA ET INTERET POUR LE DIAGNOSTIC DU SYNDROME DES OVAIRES POLYKYSTIQUES.	43
INTRODUCTION.....	45
MATERIELS ET METHODES.....	47
RESULTATS	51
DISCUSSION.....	53

CONCLUSION	56
REFERENCES	57
ANNEXES	60
Tableau 1	60
Tableau 2	61
Tableau 3	61
Tableau 4	62
Tableau 4b	62
Tableau 5	63
Tableau 6	64
Figure 1	65
Figure 2	66
Figure 3	67
6. DISCUSSION	68
7. CONCLUSION	73
8. BIBLIOGRAPHIE	74

1. ABBREVIATIONS

A :	Delta 4 androstènedione	LC-MS/MS :	Liquid Chromatography Tandem Mass spectrometry
AMH :	Hormone Anti-Müllerienne	LH:	Hormone luteinisante
ANOVA :	Non parametric analysis of variance	NIH :	National Institute of Health
AUC :	Area under the curve	OA :	Oligo-anovulation
BMI :	Body mass index	OHP :	Hydroxyprogesterone
CFA :	Compte des follicules antraux	OPK :	Ovaires polykystiques
DHA-S :	Déhydroépiandrosténedione-sulfate	PCOM :	Polycystic ovarian morphology
DHT :	Dihydrotestostérone	PCOS :	Polycystic ovary syndrome
E2 :	Estradiol	RIA :	Radio immunoassay
FNPO :	Follicle Number Per Ovary	ROC :	Receiver Operating Characteristic
FSH :	Follicle stimulating hormone	SHBG :	Sex-Hormone Binding Globuline
GC :	Granulosa Cells	SOPK :	Syndrome des ovaires polykystiques
GnRH :	Gonadotropin Releasing Hormone	T :	Testosterone
HA :	Hyperandrogénie	U/S :	Ultrasound
IGF-1 :	Insuline Growth Factor-1	VO :	Volume Ovarien

2. INTRODUCTION

LE SYNDROME DES OVAIRES POLYKYSTIQUES

Le SOPK est une pathologie endocrinienne fréquente de la femme en âge de procréer. Elle représente la première cause d'infertilité anovulatoire.

De grandes variabilités cliniques phénotypiques existent chez les patientes SOPK et la prévalence varie donc selon la classification diagnostique utilisée. Depuis 2003, la conférence de consensus de Rotterdam définit le SOPK sur l'association d'au moins deux critères parmi :

- une hyperandrogénie (HA) clinique et/ou biologique ;
- une oligo- et/ou anovulation (OA) ;
- des ovaires polykystiques morphologiques caractérisés par un compte des follicules antraux (CFA) de 2 à 9 mm supérieur à 12 par ovaire et/ou un volume ovarien (VO) supérieur à 10 ml lors de l'échographie pelvienne (*ESHRE Rotterdam- 2003*).

Ce dernier critère semblerait désuet, du fait de l'amélioration technique des sondes d'échographie. Certains auteurs proposent de fixer ce seuil à 19 follicules antraux par ovaire voire 25 (*Dewailly et al 2011 ; Lujan et al 2013*) pour parler de « polycystic ovarian morphology » (PCOM).

Deux autres classifications ont défini ce syndrome en exigeant la présence de l'hyperandrogénie pour retenir le diagnostic : The National Institute of Health/National Institute of Child and Human Disease (NIH/ NICHD) (*Zawadski et al 1992*) et « Androgen Excess et PCOS society » (*Azziz et al 2006*) (Tableau 1).

Tableau 1 : Prévalence du SOPK selon la classification diagnostique utilisée.

	NIH/ NICHD 1992	Rotterdam ESHRE 2003	Androgen Excess Society 2006
Critères	<ul style="list-style-type: none"> • HA clinique et/ou biologique ET • Oligo-anovulation 	Deux critères parmi : <ul style="list-style-type: none"> • HA clinique et/ou biologique • Oligo-anovulation • Ovaires polykystiques (OPK) 	<ul style="list-style-type: none"> • HA clinique et/ou biologique ET • Oligo-anovulation ou ovaires polykystiques (OPK)
<i>March et al</i>	8.7%	17.8%	12%
<i>Eilertsen et al</i>	-	21.4%	16.8%
<i>Yldiz et al</i>	6.1%	19.9%	15.3%
<i>Tehrani et al</i>	7.1%	14.6%	11.7%
<i>Rashidi et al</i>	4.8%	14%	12%
<i>Mehrabian et al</i>	7%	15.2	7.9%

L'inclusion du critère OPK échographique pour le diagnostic a considérablement augmenté la prévalence du SOPK.

La physiopathologie du SOPK repose sur plusieurs facteurs : l'HA, l'insulinorésistance, mais également des facteurs génétiques, environnementaux et nutritionnels.

Certains diagnostics différentiels devront être écartés avant de confirmer le SOPK: le syndrome de Cushing, l'hyperplasie congénitale des surrénales, les tumeurs ovariennes et surrénaliennes sécrétantes ainsi que l'hyperprolactinémie.

La définition du SOPK suscite toujours le débat et conserve quelques problèmes de subjectivité :

- Difficulté à définir les populations hyperandrogéniques : variabilité des taux plasmatiques des stéroïdes selon les techniques de dosage utilisées, seuil du score de Ferriman et Gallwey fixé à 6 ou 8 selon les praticiens, subjectivité de l'examen clinique et de l'interrogatoire (possible sous-estimation de la pilosité).
- Le compte des follicules antraux varie selon la résolution de l'appareil échographique étudié : un seuil à 12 follicules par ovaire en utilisant une sonde échographique à hautes fréquences amènerait à classer à tort certaines patientes témoins en PCOM.
- Aucun marqueur ne permet de poser à lui seul le diagnostic.

L'enjeu d'un diagnostic précis est grand car le diagnostic de SOPK place ces patientes dans un groupe à haut risque cardiovasculaire et métabolique : obésité, hypertension artérielle, intolérance aux hydrates de carbones, dyslipidémie, infertilité, carcinome endométrial (*Azziz et al 2004*). Elles s'exposeraient également à un risque plus élevé de fausse couche spontanée (*Glueck et al 2001*).

Certains auteurs suggèrent que des ovaires polykystiques morphologiques (PCOM) isolés pourraient représenter une forme silencieuse de SOPK (*Johnstone et al 2010*) ; d'autres au contraire évoquent l'hypothèse d'une simple variante de la normale (*Franks et al 2008*). Les patientes OPK asymptomatiques (PCOM) sont, dans beaucoup d'études, retrouvées au sein du groupe témoin pouvant perturber alors l'interprétation des résultats. Pour limiter ce biais, une analyse par cluster permet d'améliorer la puissance statistique de l'étude en identifiant les « vraies » patientes contrôles par l'exclusion de ces PCOM.

Le SOPK revêt un caractère héréditaire (*Kahsar-Miller et al 2001*). La transmission serait dominante à faible pénétrance, d'expressivité variable. Son origine génétique est complexe et impliquerait de multiples gènes tels que le cytochrome P-450c17 (CYP17), CYP11A SSC, CYP 21 hydroxylase, STAR, le récepteur aux androgènes, la Sex-Hormone Binding Globuline (SHBG), le récepteur à l'insuline et l'insulin-like growth factor 1 (IGF-1). Les régions chromosomiques 2p16.3, 2p21 et 9q33.3 seraient impliquées (*Kosova et al 2013 ; Chen et al 2011*). Par ailleurs, le gène DENND1A, surexprimé chez les patientes SOPK, aurait un rôle clé dans la physiopathologie de l'hyperandrogénie (*McAllister et al 2014*).

L'HORMONE ANTI-MÜLLERIENNE

Généralités

L'hormone anti-Müllerienne (AMH), bien que n'apparaissant pas dans les classifications diagnostiques précédemment citées, est très souvent utilisée en pratique quotidienne et pourrait à l'avenir venir remplacer le critère échographique de la conférence de consensus de Rotterdam.

L'AMH est une glycoprotéine de la famille de Transforming Growth Factor β (TGF β). Chez l'homme, elle est impliquée dans la régression des canaux de Müller pendant la vie fœtale (*Behringer et al 1994*).

Chez la femme, l'AMH est décelée dans les cellules de la granulosa à partir de la 25^{ème} semaine de gestation jusqu'à l'âge de la ménopause (*Kuiri-Haninen et al 2011*). Elle est exprimée depuis le stade de follicules primaires jusqu'au stade de petits follicules antraux (*Durlinger et al 2002*). Elle persisterait néanmoins dans les cellules du cumulus du follicule pré ovulatoire.

Plusieurs études ont évoqué le rôle de l'AMH dans le blocage de maturation folliculaire responsable d'une oligo-anovulation. Différents mécanismes sont en jeu (Figure 1) :

- L'inhibition du recrutement folliculaire initial ;
- L'inhibition de l'expression du récepteur de la FSH (Follicle Stimulating Hormone) sur les cellules de la granulosa malgré des valeurs sériques normales ;
- L'inhibition de l'activité de l'enzyme aromatasase avec une réduction secondaire de la synthèse d'œstradiol (*Pellat et al 2011*).

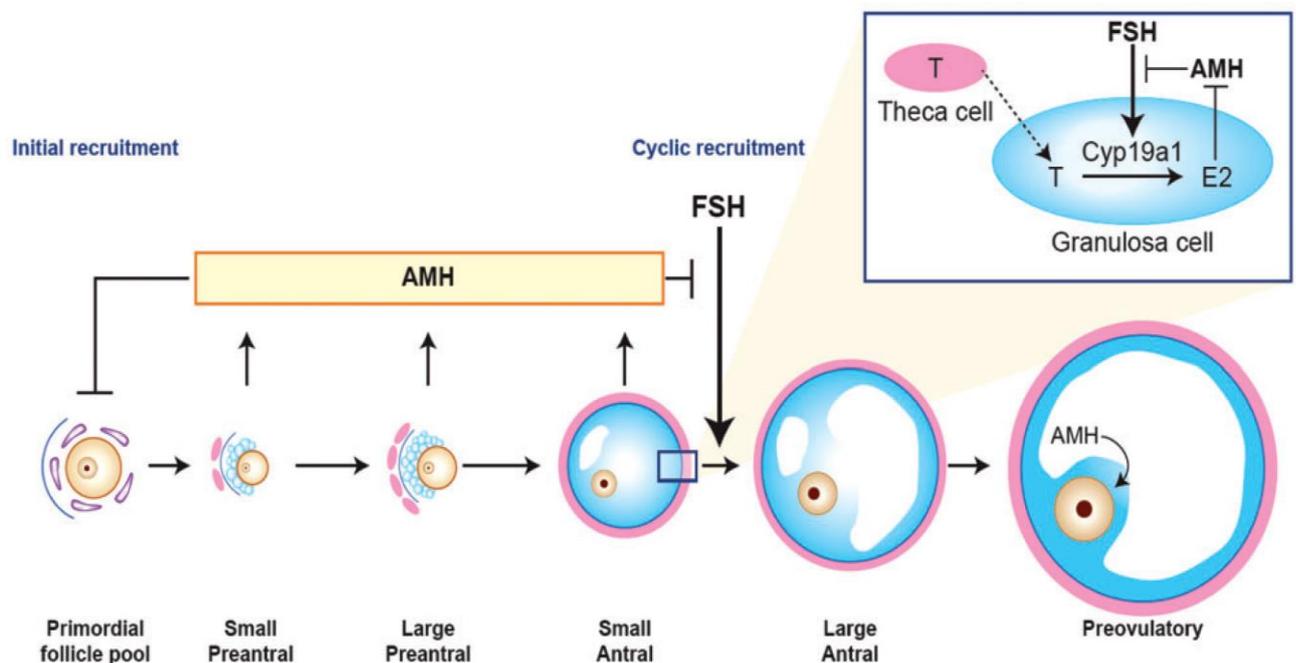


Figure 1 : Les niveaux d'action de l'AMH au sein de l'ovaire (*Dewailly et al 2014* ; *Van Houten et al 2010*) : inhibition du recrutement folliculaire initial, de l'expression du récepteur de la FSH et de l'expression du gène Cyp 19a1 de l'aromatase au sein des cellules de la granulosa.

Les valeurs sériques de l'AMH ne varient que très peu au cours du cycle. Son expression est maximale dans les cellules de la granulosa des follicules secondaires, préantraux et petits antraux de moins de 5 mm. Elle décroît ensuite graduellement pour ne plus être exprimée dans les follicules mesurant plus de 8 mm de diamètre (*Weenen et al 2004*). L'AMH occupe une place importante dans le bilan féminin d'infertilité comme reflet de la réserve ovarienne. Son taux serait entre deux à quatre fois supérieur chez les patientes SOPK comparées aux témoins (*Pigny et al 2003; Laven et al 2004*). Sa forte corrélation avec le compte des follicules antraux est aujourd'hui bien démontrée (*Pigny et al 2006*).

Techniques de dosage

Sur le plan moléculaire, l'AMH est présente dans la circulation sanguine sous deux formes (*Pigny 2014*) :

i) une forme non clivée inactive également appelée ProAMH et ii) une forme clivée biologiquement active appelée AMH_{N,C}. Il est admis que le complexe de fragments N et C, associé de façon non covalente, ainsi que le fragment C-terminal seul peuvent se fixer au récepteur de type II spécifique de l'AMH (AMHR-II) (*Di Clemente et al 2010*). L'association des deux régions serait indispensable à la stabilité de l'AMH ainsi qu'à la transduction du signal.

Lorsque son dosage est réalisé manuellement, il dure entre 5 et 6 heures et utilise la technique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) en microplaques de 96 puits. Les trousseuses utilisées en France sont: EIA-AMH/MIS développée par Immunotech, Gen II développée par la société Beckman Coulter et les kits mis sur le marché par Anshlabs dont AL-105i.

La trousse EIA AMH/MIS utilise des anticorps monoclonaux dirigés contre la forme clivée de l'AMH, biologiquement active, sur la région C terminale mature et également contre la pro-AMH. Sa sensibilité fonctionnelle s'élève à 2.5 pmol/l (0.35 ng/ml). Sa spécificité peut être

limitée par une réaction croisée en présence dans l'échantillon d'anticorps anti hétérophiles (*Cappy et al 2013*).

La trousse AMH Gen II possède une sensibilité fonctionnelle de 1.50 pmol/l (0.21 ng/ml) (*Wallace et al 2011*). Elle utilise des anticorps monoclonaux de souris qui se fixent sur la région C terminale mature de l'AMH, mais également sur la pro-région N terminale (*Kevenaer et al 2006*).

Les premières études de corrélation des techniques EIA AMH/MIS et Gen II ont été initialement médiocres car faussées par l'interférence avec le complément dans la technique Gen II mise en évidence en 2013 par *Beckman Coulter*. Les valeurs d'AMH étaient alors deux fois supérieures avec EIA AMH/Mis par rapport à Gen II. Par la suite, la pré-dilution du sérum a permis de rétablir une bien meilleure équivalence des taux.

La trousse de dosage ultrasensible AL-105i d'Anshlabs, avec une sensibilité fonctionnelle plus basse à 0.42 pmol/l (0.06 ng/ml), serait plus adaptée pour les patientes présentant une insuffisance ovarienne ainsi que pour le suivi de l'AMH après traitement gonadotoxique. En 2014, la société Anshlabs a mis sur le marché un nouveau kit de dosage AL-124i dont la limite de quantification est extrêmement basse à 0.028 pmol/l (0.004 ng/ml) offrant des perspectives d'autant plus intéressantes pour le suivi de ces patientes après chimiothérapie (*Decanter et al 2010*).

La validation d'un seuil valide universel pour l'AMH demeure difficile du fait d'une grande variabilité et hétérogénéité entre ces différentes techniques de dosage sérique utilisées.

L'automatisation des techniques de dosages s'est développée depuis quelques mois dans le but d'augmenter la reproductibilité et la rapidité des dosages de l'AMH. Ainsi les deux sociétés Beckman Coulter et Roche Diagnostics ont développé son dosage sur des automates d'immunoanalyse. La nouvelle technique Elecsys-AMH, développée par la société Roche, a été récemment étudiée par *Gassner et al.* Cette méthode de dosage totalement automatisée est basée sur la technologie de l'électrochimiluminescence Elle détecte l'AMH totale et sa sensibilité fonctionnelle est de 0.21 pmol/l (0.03 ng/ml). Ses atouts sont sa rapidité (18 minutes), le faible volume requis, et sa grande reproductibilité par rapport à une méthode manuelle ou semi automatisée.

La mise à disposition d'un standard international de l'AMH apparaît aujourd'hui légitime et indispensable pour pouvoir envisager son inclusion dans la classification diagnostique du SOPK.

L'HYPERANDROGENIE

Généralités

La place du critère HA clinique et/ou biologique dans le diagnostic du SOPK est aujourd'hui imprécise (le consensus de Rotterdam n'exige d'ailleurs pas sa présence dans sa définition).

Plusieurs études ont démontré la corrélation positive entre les taux sériques de l'AMH et des androgènes en particulier la testostérone (*Pigny et al 2006 ; Laven et al 2004 ; Carlsen et al 2009*).

Chez la femme, l'HA est présente chez 60 à 80% des SOPK (*Fauser et al 2012*). Son rôle dans la physiopathologie du SOPK a été clairement démontré. L'étude de *Abbott et al* réalisée sur des primates, démontre que l'exposition excessive aux androgènes pendant la vie fœtale augmente considérablement le risque de développer un SOPK à la puberté.

L'excès d'androgène serait à l'origine d'une augmentation de petits follicules par deux mécanismes :

- En stimulant la croissance folliculaire à partir du follicule primaire via l'augmentation de l'expression des récepteurs de la FSH (*Sen et al 2014*). Dans cette étude réalisée chez des souris « androgen-receptor knock-out » (ARKO), l'ajout de dihydrotestostérone (DHT) augmente significativement la sensibilité des follicules préantraux à la FSH, optimisant ainsi leur transition en follicules antraux ;
- En inhibant l'atrésie folliculaire (*Sen et al 2014 ; Jonard et al 2004*). Les récepteurs aux androgènes (RAs) amélioreraient l'expression du microARN miR-125b impliqué dans la régulation de l'apoptose. Dans l'étude de Sen et al, chez les souris ARKO dont les RAs ont été inactivés, le pourcentage d'atrésie folliculaire est élevé, en rapport avec une plus faible expression de miR-125b.

La stéroïdogénèse ovarienne

Chez une patiente témoin, la stéroïdogénèse ovarienne, se déroule au sein des cellules de la thèque dès le stade de follicule préantral (*Magoffin et al 2004*). Situées au niveau du stroma interfolliculaire, ces cellules thécales participent notamment à la production de la delta 4 androstènedione (A), précurseur direct de la testostérone (T) qui sera métabolisé en œstrogène au niveau des cellules de la granulosa sous l'action de l'aromatase (théorie bicellulaire). La LH (hormone lutéinisante), par la présence de récepteurs sur ces cellules de la thèque, régule cette stéroïdogénèse alors que la FSH induit l'activité de l'aromatase.

Certains facteurs sont capables de stimuler l'action de la LH tels que l'insuline, l'IGF-1, l'inhibine B, le Nerve Growth Factor (NGF) et le Growth differentiation factor 9 (GDF-9). D'autres au contraire peuvent l'inhiber tels que le Transforming Growth Factor β (TGF β), TGF α_6 et le Keratinocyte Growth Factor (KGF) (*Magoffin et al 2002*).

Tout au long de la folliculogénèse il s'agit d'un véritable dialogue entre les cellules thécales et la granulosa.

Chez une patiente SOPK, il existe une hyperplasie intrinsèque des cellules de la thèque (*Gilling Smith et al 1997 ; Magoffin et al 2003*) mais également un défaut de rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo hypophysaire par la progestérone et l'œstradiol (*Catteau-Jonard et al 2013*). Le taux sérique de LH est plus élevé avec une inversion du rapport LH/FSH, conséquence de l'augmentation de la fréquence et de l'amplitude des pulses de GnRH.

L'excès de sécrétion d'androgènes pendant la période péri pubertaire serait à l'origine de la réduction de sensibilité intrinsèque du générateur d'impulsion de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) à l'action inhibitrice de la progestérone. En effet la progestérone, dont les taux sont relativement bas en cas d'anovulation, est connue pour ralentir les pulses de GnRH.

L'HA à l'adolescence, prédisposée par des facteurs génétiques, est aujourd'hui reconnue comme précurseur de SOPK à l'âge adulte.

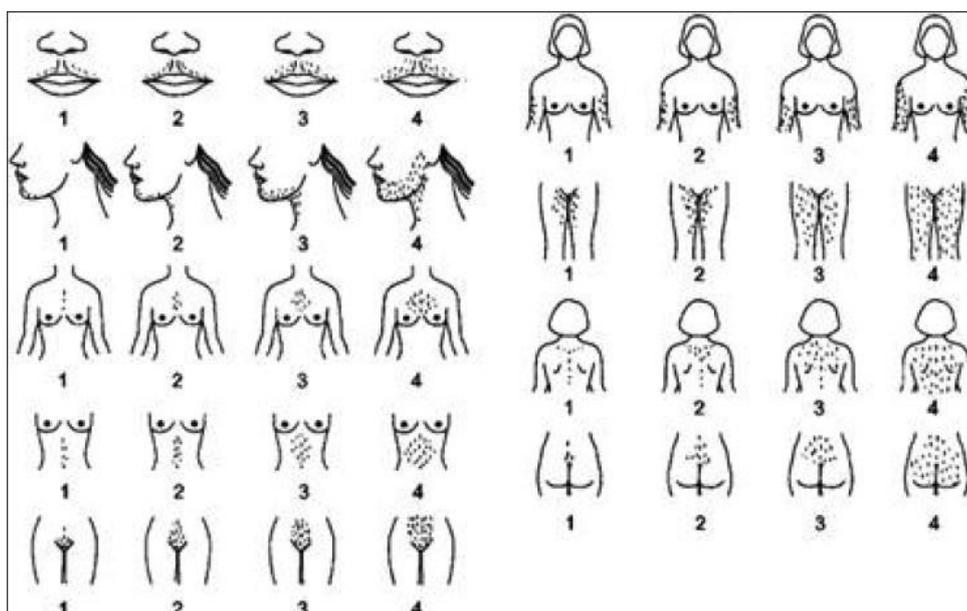
De plus, l'hyperinsulinisme potentialise la stéroïdogénèse induite par la LH au sein des cellules de la thèque.

La physiopathologie de l'HA demeure cependant toujours du domaine de la recherche.

Définition clinique

L'HA peut se manifester au travers de divers symptômes :

- i) un hirsutisme (chez 70% des SOPK (*Fauser et al 2012*)): une pilosité excessive pouvant être typiquement localisée au niveau du visage (lèvre supérieure, menton), de l'abdomen, du torse, des bras, de la face interne des cuisses et du dos. Il est coté selon le score de Ferriman et Gallwey, dont les items sont rappelés dans la figure suivante :



Un score supérieur ou égal à 6 sera positif. Son évaluation reste néanmoins subjective. La sévérité de l'hirsutisme ne semble que modérément corrélée aux valeurs sériques des androgènes.

- ii) une acné (présente chez 15-30% des SOPK (*Azziz et al 2004*)) : localisée le plus souvent sur le visage, le cou, le thorax et le haut du dos. Les données sur la corrélation entre la gravité de l'acné et la sévérité de l'HA demeurent contradictoires (*Green J et al 2000*).

- iii) une alopecie androgenique avec une chute des cheveux progressive diffuse sur le haut du vertex hormis la ligne bordante frontale.
- iv) des signes majeurs de virilisation tels que cliteromegalie, voix rauque, hypotrophie mammaire, epaules elargies.

L'ensemble de ces manifestations cliniques peuvent retentir sur l'etat psychologique de ces jeunes patientes.

Définition biologique

La définition biologique de l'HA demeure plus complexe. Les principaux androgenes synthetises chez la femme pre menopausee sont : la delta 4 androstenedione (A), la Testosterone (T), le dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), la dehydroepiandrosterone (DHEA), la dihydrotestosterone (DHT). Le DHEAS, DHEA et l'A ne seront biologiquement actifs qu'une fois convertis en T au niveau des ovaires, des surrenales ou des tissus peripheriques.

Sa définition biologique est aujourd'hui problematique devant l'absence de consensus sur le choix de l'androgene, et l'absence de valeurs seuils universelles.

En theorie, le dosage urinaire sur 24 heures des metabolites androgeniques serait le plus efficace mais reste couteux et de realisation longue. De ce fait, le dosage de la T totale reste le plus utilise en pratique quotidienne pour definir une HA. Mais son dosage presente quelques faiblesses qui remettent en question sa superiorite. Circulant sous forme liee a la SHBG et plus faiblement a l'albumine, la T atteint les organes cibles uniquement sous forme libre.

Une valeur elevee de T libre serait le meilleur reflet de l'HA. Cependant, certaines etudes ont mis en avant l'imprecision du dosage de T libre par la technique de radio-immunodosage, ainsi qu'une forte variabilite des valeurs en immunodosage direct. Il ne devrait donc pas etre

réalisé. Le « Free Androgen Index » (FAI : $[T \text{ totale} / \text{SHBG}] \times 100$) permet d'en faire le calcul. Ce FAI est biaisé en cas d'hyperinsulinisme du fait d'une diminution du taux de SHBG. Il apparaît donc plutôt comme un marqueur métabolique qu'androgénique.

En parallèle de cette synthèse ovarienne, la T provient pour 70% de la conversion périphérique des androgènes surrénaliens.

Mais qu'en est-t-il du dosage de delta 4 androstènedione et de sa légitimité dans le diagnostic de SOPK ?

LA DELTA 4 ANDROSTENEDIONE ET SON DOSAGE

La delta 4 androstènedione, est sécrétée pour 70% par les cellules thécales de l'ovaire, 25% par les surrénales et 5% à partir de son précurseur direct, le dihydroépiandrostènedione, dans les tissus périphériques. Au niveau ovarien, elle est le précurseur direct de la T dans les cellules thécales sous l'action de la 17 hydroxysteroid deshydrogénase et de l'œstradiol sous l'action de l'aromatase au sein des cellules de la granulosa.

A ce jour, les praticiens ne pratiquent pas tous son dosage de façon systématique devant l'incertitude de sa validité pour différencier les patientes SOPK des contrôles.

La technique de radio-immunodosage

Pour le dosage de stéroïdes, la technique d'immunodosage est largement utilisée depuis plusieurs décennies. La technique de radio immunodosage (RIA : Radio-immuno Assay) a été mise au point dans les années 1950 par Solomon Aaron Berson et Rosalyn Sussman Yalow et leur a valu le prix Nobel. Elle repose sur le principe de liaison compétitive entre l'antigène dosé et un antigène marqué par un radio isotope, sur un anticorps spécifique. Un complexe anticorps (Ac) antigène (Ag) se forme alors.

Le signal (radioactivité) détecté sera inversement proportionnel à la concentration de l'antigène à doser.

Les marqueurs radioactifs (surtout l'iode 125) ont été largement utilisés, notamment grâce à la haute sensibilité de la détection. Cependant, l'utilisation de la radioactivité présente un inconvénient majeur puisqu'elle est restreinte aux seuls laboratoires agréés pour la manipulation de radioéléments et doivent être équipés d'automates utilisant un compteur de rayonnement Gamma. Cette méthode nécessite une main d'œuvre conséquente et souffre d'une faible reproductibilité et d'interaction Ac-Ag en présence de la matrice pouvant altérer sa spécificité.

Des développements méthodologiques importants en immunodosage ont permis de remplacer progressivement les éléments radioactifs par des enzymes. Aujourd'hui, les marqueurs enzymatiques et les marqueurs luminescents connaissent un essor considérable en pratique courante sur les automates de biologie médicale et ont en grande partie supplanté la RIA.

La Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

La technique LC-MS/MS associe les performances de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse en tandem. Sa mise au point a débuté en 1974.

Dans un premier temps, la chromatographie en phase liquide permet de séparer les molécules présentes dans l'échantillon sanguin. L'Ultra-Performance Liquide Chromatographie (UPLC) est une nouvelle technologie de séparation qui possède les caractéristiques de la chromatographie liquide de haute performance (HPLC), mais est encore plus rapide et plus sensible.

L'UPLC repose sur l'emploi d'une phase stationnaire, dans la colonne de chromatographie, composée de particules inférieures à 2 μm (versus 3 à 5 μm pour HPLC). Cela permet d'augmenter le débit, et donc la vitesse d'analyse, sans altérer les performances chromatographiques.

Les analytes obtenus sont secondairement ionisés séquentiellement dans la source du spectromètre. Celui-ci permet de quantifier la molécule par sa masse selon le schéma suivant :
Production d'ions → séparation des ions produits selon le rapport masse/charge (analyseur)
→ conversion d'un courant ionique en courant électrique (détection) → traitement du signal émis.

Maintenant que le couple chromatographie en phase liquide/spectrométrie de masse en tandem est reconnu comme technique fiable pour le dosage stéroïdien, il est nécessaire de définir les « normes » pour chaque stéroïde étudié. Par ailleurs, la technique LC-MS/MS, grâce au dosage multiplex, offre pour les laboratoires, une perspective intéressante en terme de gain de temps lors du bilan d'une HA. En effet, cette méthode permet de doser simultanément de multiples stéroïdes à partir d'un faible volume d'échantillon sanguin (*Vogeser et al*).

3. OBJECTIFS

L'objectif de ce travail est d'évaluer les performances diagnostiques des nouvelles techniques de dosage de l'AMH et de la delta 4 androstènedione dans le SOPK. Les protocoles d'étude et les résultats sont rédigés sous forme d'articles, dans le but d'être soumis à différentes revues :

- Premier article : « Comparaison de trois techniques de dosage de l'AMH (EIA AMH/MIS, Gen II, AL-105i) pour le diagnostic de SOPK » (rédaction en anglais).
- Deuxième article : « Dosage de la delta 4 androstènedione par spectrométrie de masse en tandem : Comparaison avec la technique de radio-immunodosage, et intérêt pour le diagnostic du syndrome des ovaires polykystiques ».

4. ARTICLE 1: COMPARAISON DES TECHNIQUES DE DOSAGE DE L'AMH : EIA AMH/MIS, GEN II ET AL-105i POUR LE DIAGNOSTIC DU SYNDROME DES OVAIRES POLYKYSTIQUES

COMPARATIVE ASSESMENT OF DIFFERENT SERUM ANTI-MULLERIAN HORMONE ASSAYS FOR THE DIAGNOSIS OF POLYCYSTIC OVARY SYNDROME

Pascal PIGNY¹, Elise GORISSE², Amjad GHULAM¹, Geoffroy ROBIN³, Sophie CATTEAU-JONARD³, Alain DUHAMEL⁴ and Didier DEWAILLY³

¹ Laboratoire de Biochimie & Hormonologie, Centre de Biologie Pathologie, CHRU, F-59037 Lille cedex France

² CHU de Nantes, Faculté de médecine de Nantes France

³Service de Gynécologie Endocrinienne et Médecine de la Reproduction, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU, F-59037 Lille cedex France

⁴ Unité de Biostatistiques, Faculté de Médecine, F-59045 Lille cedex France.

Authors Disclosure Statement: EG, AG, GR, SCJ, AD, DD and PP have nothing to declare.

Structured Abstract:

Context: Despite the wide clinical applications of AMH measurement, correlation, comparison of threshold value and diagnostic performance for polycystic ovary syndrome (PCOS) of the 3 widely used commercial immunoassays of serum AMH are lacking.

Objectives: Our objective was to determine the threshold value of serum AMH that predicts PCOS using 3 different commercial AMH assays.

Design and setting: Retrospective study. Serum AMH level was determined on the same serum sample by 3 assays (EIA AMH/MIS, Gen II and AL-105i) using up to date procedures in a routine laboratory practice.

Participants: We studied 66 controls (with regular cycles and without hyperandrogenemia) and 60 PCOS patients with oligo-anovulation and hyperandrogenism. Controls were submitted to cluster analysis to exclude asymptomatic patients with asymptomatic polycystic ovary morphology (PCOM).

Main outcome measure: cut-off value of AMH and sensitivity for PCOS diagnosis

Results: Gen II and AL-105i AMH values were strongly correlated to EIA AMH/MIS values ($r=0.98$ and 0.95 , respectively). Both in control and in PCOS groups, they were slightly or markedly lower than those of EIA AMH/MIS, respectively. The latter assay allowed cluster analysis isolating more PCOM controls. When setting the specificity to 98% after ROC analysis challenging the non-PCOM controls to PCOS, the EIA AMH/MIS assay offered the highest sensitivity (97% vs 92% and 75% with Gen II and AL-105i, respectively, with cut-off values of 41, 44 and 32 pmol/l, respectively).

Conclusion: The three AMH assays are powerful tools for the diagnosis of PCOS but the threshold value and sensitivity depend on the immunoassay used.

Key Words: AMH, PCOS.

INTRODUCTION

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a common endocrine disorder affecting up to 10% of women of reproductive age (1). The current diagnosis classification use hyperandrogenism (HA), oligo-anovulation and polycystic ovarian morphology (PCOM) at ultrasound (U/S). Due to its strong correlation with the number of growing follicles within the ovary (2)(3), we previously proposed to use the serum level of Anti-Müllerian Hormone (AMH), a specific product of granulosa cells (GC) (3), as a surrogate for follicle number at U/S (4). Using Receiver Operating Characteristic curve (ROC) analysis and the EIA AMH/MIS assay, we recently proposed a revised threshold value of AMH above 35 pmol/l as a surrogate for the follicle excess which characterizes PCOM (5). Therefore, since we have now at our disposal two different markers, one being morphological (PCOM) and the other being biochemical (serum AMH), we questioned previously (6) whether the use of the acronym “PCOM” that relates only to morphology is still valid. We would rather propose the terms “polycystic ovary-like (PCO-like) abnormalities”. However, we kept “PCOM” in this report as it is so far the term internationally agreed upon.

Unfortunately the different commercially available immunoassays used to measure AMH levels in the serum provided different results on the same sample. These differences are consecutive to: *(i)* the absence of an international standard for AMH, *(ii)* differences in the specificity of the antibodies used in the different kits, *(iii)* the existence of different molecular forms of AMH at the circulating level (7) and *(iv)* variable sensitivity of the immunoassays to interferences such as complement C1q and C3 (8), macroprolactinemia or heterophilic antibodies (9). For example, until July 2013, complement interference in the Gen II assay resulted in falsely low AMH values around 2 fold less than those obtained with the EIA AMH/MIS (8)(10). A modified technical procedure has been recently released by the manufacturer to solve this problem (11).

Such heterogeneity in the results has so far prevented the definition of a unique threshold value of serum AMH to distinguish normal women from patients with PCOS (reviewed in 11). Now that three consolidated immunoassays are commercially available and widely distributed, this issue needs to be re-addressed. For that aim, we decided to measure AMH levels on serum samples from controls and PCOS patients with these 3 AMH assays (Gen II, EIA AMH/MIS and Anshlab AL-105i) using up-to-date technical procedures, both to address inter-kit variability and to determine by ROC analysis the kit-specific threshold value of AMH to be used for the definition of PCOM.

MATERIALS AND METHODS.

Patients

Data from the 126 patients included in this study were obtained from a database including clinical, hormonal and U/S features that were consecutively recorded in 2012, 2013 and 2014. These patients were referred to our department for exploration of HA, menstrual disorders and/or infertility due to male factor and/or tubal abnormality. Women with unexplained infertility or endometriosis were excluded. Clinical, hormonal and U/S examinations were performed in the early follicular phase, between day 2 and 5 of the menstrual cycle. In patients with menstrual disorders, the last menstrual period was either spontaneous or induced by the administration of dydrogesterone (10 mg/d for 7 days). This 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.

Exclusion criteria were the following: age less than 18 or more than 35 years, suspicion of low ovarian reserve (FSH>12 IU/L and/or follicle number per ovary (FNPO) <6 and/or ovarian volume (OV) <2.3 ml) (5), hyperprolactinemia (serum prolactin >20 ng/ml on two subsequent determinations) or nonclassic 21-hydroxylase deficiency (basal 17-hydroxyprogesterone (OHP) >5 ng/ml and/or post-ACTH stimulated value >12 ng/ml). Ovarian or adrenal tumors

were excluded on the basis of serum total testosterone (T) or dehydroepiandrosterone-sulfate (DHA-S) level lower than 1.5 ng/ml or 15 μ mol/l, respectively. Any patient with criteria for hypothalamic amenorrhea was also excluded. Furthermore, any patient with at least one follicle with a diameter greater than 9 mm at U/S or a serum estradiol (E2) level above 80 pg/ml was excluded from the study.

Investigations

During the medical examination, patients were specifically asked about their menstrual history. Oligomenorrhea was defined as an average cycle length of more than 35 days and included women with amenorrhea. Clinical HA was defined by the presence of hirsutism (modified Ferriman-Gallwey score over 6) and/or acne located in more than 2 areas. Hyperandrogenemia was defined as a serum T level >0.5 ng/ml and/or a serum androstenedione (A) level >2.05 ng/ml.

Prolactin, luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), E2, OHP, DHAS and T levels were measured by immunoassays as described previously (13). Serum A was measured by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (unpublished data). For every patient, U/S determination of FNPO and OV was performed with a Voluson E8 Expert (General Electric Systems, VELIZY, France) with a 5-9 MHz transvaginal transducer, as described previously (14).

AMH Assays

AMH was measured on the same serum sample stored frozen at -80°C in our biobank by the same operator using 3 commercially available assays: EIA AMH/MIS (A11893 Immunotech, Beckman Coulter, F), Gen II (A79765, Beckman Coulter, F) and Ultrasensitive AL-105i (Anshlab, Webster, TX). All three assays measure the proAMH and the cleaved AMH complex (AMH_{N,C}). All assays have similar measurable range up to 150 pmol/l (EIA

AMH/MIS), 178 pmol/l (Gen II) or 128.5 pmol/l (AL-105i). Each sample that generated an AMH value above 60 pmol/l was re-assessed after a 1/2 or 1/4 dilution. Assays were run simultaneously (two on the same day, the third the next day) from March to April 2014 according to the technical procedures recommended by the manufacturers which now include a systematic pre-dilution step of each sample for the Gen II kit. Results were expressed in pmol/L (1ng AMH corresponds to 7.14 pmol).

Statistical Analysis.

For description of populations, results are expressed as median with 5th and 95th percentiles. Comparisons between two groups were performed using the non-parametric Mann-Whitney test and comparisons between more than two groups were performed using the Kruskal-Wallis test and a non-parametric analysis of variance (ANOVA) after rank transformation using the methodology suggested by Conover and Iman (15). The Bonferroni correction was applied for multiple comparisons in post hoc tests.

For comparison of the three AMH assays, the Wilcoxon test was used for paired-comparisons of ranks and the regression procedure was carried out using the Passing Bablok method (16).

In order to eliminate asymptomatic patients with PCOM from the control group, we analyzed its homogeneity by a cluster analysis as previously described (5). The variables that are considered as markers of PCOM, i.e., FNPO, OV, AMH, LH, T, and A were included in the analysis. Age of the patients was also included since it may confound some variables. This analysis was performed separately with AMH values from each assay.

ROC curves were constructed to examine the diagnostic test performance of each AMH assay, i.e., the ability to discriminate between groups (17), as previously described (5).

All statistical analyses were performed with SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

First, we compared the AMH values obtained with the 3 AMH kits in the entire study population (n=126). The AMH values provided by Gen II and AL-105i kits were highly correlated with those generated with the EIA AMH/MIS kit ($r=0.980$, $p<0.001$; $r=0.950$, $p<0.001$, respectively). However, Gen II with the modified procedure yielded slightly lower values than EIA AMH/MIS (Passing-Bablok regression: Gen II = $0.914 \times \text{EIA AMH/MIS} - 0.717$). Values obtained with AL-105I were markedly lower than with EIA AMH/MIS ($\text{AL-105i} = 0.655 \times \text{EIA AMH/MIS} - 1.303$) (Figure 1). These results thus demonstrate the need to use kit-specific threshold AMH values for the definition of PCOM.

According to their symptoms, the 126 patients included in this study were divided into two groups: control group (n=66) including women without HA (clinical or biological, see M&M) and with regular menses (non-PCOS group) and PCOS group (n=60) including women with both HA and oligo-anovulation, i.e., patients with genuine PCOS as defined by the current classifications (18)(19). U/S data were not used in this classification. The main clinical, hormonal and U/S features of each group are shown in table 1. In agreement with our regression study, the ranks of AMH values were significantly higher with the EIA AMH/MIS assay than with the 2 others, in both populations (Table 1).

Following our previous strategy (5), we then attempted to detect a homogenous subgroup of women with PCOM among our whole control group (n=66) through cluster analysis including age, T, A, FNPO, OV, LH and AMH as classifying variables. Three analyses were run separately, each using AMH values from each assay. In these 3 analyses, the models with more than 2 clusters were not accompanied by a significant increase of total R^2 . We therefore considered that with each assay, the whole control group was cleaved in 2 subgroups (IA and IB) by cluster analysis. As shown by the correlation coefficient between each variable and the discriminant score obtained by cluster analysis (Table 2), the critical parameters for this classification were primarily the serum AMH level and then the FNPO, A and OV whatever

the AMH assay used. Interestingly, when the analysis was performed using the EIA AMH/MIS values, the coefficient for FNPO was weaker than in analysis performed with AMH values from Gen II and AL-105i assays (Table 2). Conversely, the coefficients for A and FSH were stronger (Table 2).

The composition and size of group IB varied according to the AMH assay used: 21 controls were classified IB when the EIA AMH/MIS values were used while only 16 and 13 were so with the Gen II and the AL-105i values, respectively (chi-2 test: $p < 0.0001$ for both). In both two latter IB subgroups, only one patient was classified IA using the EIA AMH/MIS values. Conversely, the IB subgroup from the analysis using EIA AMH/MIS values included 6 and 9 patients classified IA with the Gen II and the AL-105i values, respectively. As shown in table 3, each IB group differed from its respective IA group by significantly higher levels of AMH (Figure 2), FNPO, A and OV (the latter except for AL-105i), thus suggesting that group IB was composed of asymptomatic patients with PCOM, whatever the AMH assay used.

In order to use “pure” controls, we decided therefore to exclude group IB from the data in a kit specific manner. Therefore, the control group size was 45, 50 and 53 for the EIA AMH/MIS, Gen II and AL-105i kits, respectively (Table 3). Then we performed three independent ROC analysis using AMH values from the control group derived from each assay-specific cluster analysis and from PCOS patients ($n=60$). As shown in Table 4, the area under the curve (AUC) was the greatest with the EIA AMH/MIS values, followed by Gen II and then AL-105i values, but the differences were not significant. Only a trend ($p=0.09$) was observed between EIA AMH/MIS and AL-105i. The threshold value chosen for yielding specificity around 98% varied according to the assay used (Table 4). Sensitivity at this threshold was significantly higher with the EIA AMH/MIS assay than with the other 2 assays (Chi-2 test, $p < 0.05$ for both) (Table 4 and Figure 2).

When the control group derived from cluster analysis using the EIA AMH/MIS values was used instead of assay-specific control group, ROC analysis yielded a 5% gain of sensitivity with Gen II, with a threshold at 39.5 pmol/l instead of 44 pmol/l, which is closer to the optimal threshold chosen for the EIA AMH/MIS assay (Table 4). Conversely, with the AL-105i assay, the optimal threshold remained at 32 pmol/l, with no gain in sensitivity although slight improvement of AUC (Table 4).

Regarding the false negative PCOS patients, four were lost by all the AMH assays, four were not detected by both Gen II and AL-105i assays, and six were not detected by AL-105i assay only. However, in these last cases, the measured AMH concentrations were close to the threshold, varying from 28.1 to 31.6 pmol/l.

DISCUSSION

First, our regression study indicates very strong correlations between all 3 assays. Nevertheless, the EIA AMH/MIS assay generated higher levels of circulating AMH than Gen II and more significantly than AL-105i, both in controls and in women with PCOS. Whether this is purely artificial because of the different calibrators used in each assay or whether it reflects different efficiencies in the capture of the several molecular forms of circulating AMH between assays was not addressed in our study. Indeed, difference in specificity cannot be involved since all assays recognize both the proAMH and the cleaved AMH_{N,C}.

Cluster analysis allowed to distinguish not subjectively two homogeneous sub-groups among control women, the smallest being most presumably representative of women with PCOM. As previously reported (5), serum AMH, whatever the dosage used, was the most potent variable for this classification. However, the cluster analysis using the EIA AMH/MIS values detected significantly more control women with PCOM than analysis using values from the other assays. Group IB with this assay represented 32% of the total control group, which is similar to the previously reported prevalence of PCOM in control women with the

former U/S criteria (reviewed in 20). Conversely, the weaker correlation coefficient of FNPO to the discriminant score could suggest that this analysis yielded more false positive cases than analysis with the other assays. However, serum A and FSH levels had more strength as classifying variables than in analysis with other AMH assays. This suggests indirectly that this analysis detected more control women with PCOM by taking in account not only their follicle excess but also their subtle PCO-like endocrine abnormalities, as previously reported in such women (21). Indeed, increased serum A and decreased serum FSH levels are considered valuable biomarkers of PCOS, especially when the former is assayed by LC-MS/MS (22), as we did in the present study.

In agreement with such improvement in detecting control women with PCOM, the EIA AMH/MIS assay gave better results than other assays in ROC analysis challenging the assay-specific “true” controls *vs* the PCOS group. This allowed choosing a threshold at 41 pmol/l, yielding high sensitivity and specificity rates. If one wished keeping the same specificity, sensitivity with the two other assays was significantly less if using assay-specific control group. Conversely, when the 3 assays were challenged using the control group derived from cluster analysis using the EIA AMH/MIS values, this difference was less for the Gen II assay but remained the same for the AL-105i assay. Our data do not allow fully explaining the better performance of EIA AMH/MIS assay for the detection of PCOM and PCOS. First, we cannot exclude an effect of “learning curve” as we use the EIA AMH/MIS assay for over 10 years, while our experience with the Gen II and AL-105i assays dates only about 1 year. Second, the calibration curve of AL-105i that contains only 2 points in the highest values (34.3 and 128.5 pmol/l) instead of 3 points for Gen II and EIA AMH/MIS can lead to an underestimation of the AMH values in this range. Whether the addition of an additional calibrator point would influence the efficiency of AL-105i was not checked because this study was built on a routine laboratory practice.

Besides this technical issue, one may wonder as to whether the EIA AMH/MIS assay would better detect not only the crude AMH excess in PCOS but also putative PCOS-specific alterations in the processing of AMH by GC that would result in a specific profile of circulating AMH molecular forms (7). Conversely, the AL-105i might be less effective to detect some AMH isoforms, which could explain why around 10% of the PCOS cases were lost exclusively by this assay. A mapping and a quantification of the different AMH isoforms at the serum levels using new tools not yet marketed should help addressing this issue.

Lastly, the diagnostic threshold of EIA AMH/MIS found in this study (41 pmol/l) was slightly higher than previously proposed by us with the same technique (35 pmol/l) (5). This can be explained by the different design of the two studies, but also by the fact that we assayed serum A by LC-MS/MS in the present study. Given the better accuracy of this technique (22), this variable had more weight in the present cluster analysis than in the previous study using a RIA (5). Presumably, this allowed a more accurate recognition of PCOM among controls, as discussed above.

In conclusion, our results indicate that EIA AMH/MIS and Gen II assays offer similar performances for the detection of PCOM or PCOS, the former being slightly better than the latter however. A realistic and practical approach would be to propose a threshold of 40 pmol/L (5.6 ng/ml) for both assays. Conversely, this threshold should be lower (32 pmol/l, 4.5 ng/ml) with the AL-105i assay that seems less sensitive in detecting PCOM or PCOS using the standard technical procedure. We discourage physicians from using conversion factors from one assay to the other given putative heterogeneity in the recognition of the circulating AMH molecular forms. In the next future, the performance of the 2 automated assays soon available (Elecsys AMH from Roche and Access 2 IA AMH from Beckman Coulter) will have to be checked but one might expect similar results since the antibodies used in these assays are the same as in the currently available Gen II assay (23). It must be reminded that so far, such thresholds remain specific for the clinical setting. Hopefully, the issue of different

results between assays and populations will be solved when an international standard of AMH is available.

Acknowledgements

We thank Fumouze Diagnostics (France) for providing the Anslabs AL-105i kits, Beckman Coulter (France) for providing the Gen II kits, Mrs A. Dassonneville and Mr A. Hequet for their expert technical assistance and Mrs L. Coppin for her help with Photoshop.

REFERENCES

- 1) Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet* 2007; 370:685-697.
- 2) La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Arsenio AC, Stabile G, Volpe A. AMH as a predictive marker in assisted reproductive technology. *Hum Reprod Update* 2010; 16:113-130.
- 3) Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, Griesinger G, Kelsey TW et al. The physiology and clinical utility of AMH in women. *Hum Reprod Update* 2014; 20:370-85.
- 4) Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Serum AMH as a surrogate for antral follicle count for definition of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:941-946.
- 5) Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, Duhamel A, Catteau Jonard S. Diagnosis of PCOS: revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod* 2011; 11:3123-3129.
- 6) Robin G, Gallo C, Catteau-Jonard S, Lefebvre-Maunoury C, Pigny P, Duhamel A, Dewailly D. Polycystic ovary-like abnormalities (PCO-L) in women with functional hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:4236-4243.
- 7) Pankhurst MW, McLennan IS. Human blood contains both the uncleaved precursor of AMH and a complex of the NH₂- and COOH-terminal peptides. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 305:E1241-E1247.
- 8) Han X, McShane M, Sahertian R, White C, Ledger W. Pre-mixing serum samples with assay buffer is a prerequisite for reproducible AMH measurement using the Beckman Coulter Gen II assay. *Hum Reprod* 2014; 29:1042-48.
- 9) Cappy H, Pigny P, Leroy Billiard M, Dewailly D, Catteau Jonard S. Falsely elevated serum AMH level in a context of heterophilic interference. *Fertil Steril* 2013; 99:1729-1732.
- 10) Pigny P, Dassonneville A, Catteau Jonard S, Decanter C, Dewailly D. Comparative analysis of two-widely used immunoassays for the measurement of serum AMH in women. *Hum Reprod* 2013; 28(S1):i311-i316.
- 11) Beckman Coulter. Urgent Field Safety Notice FSN 20434-3, July 2013. Available at: <http://www.mhra.gov.uk/home/groups/fsn/documents/fieldsafetynotice/con297532.pdf>.
- 12) Iliodromiti S, Kelsey TW, Anderson RA, Nelson SM. Can AMH predict the diagnosis of PCOS ? A systematic review and meta-analysis of extracted data. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:3332-3340.
- 13) Dewailly D, Pigny P, Soudan B, Catteau-Jonard S, Decanter C, Poncelet E, Duhamel A. Reconciling the definitions of PCOS: the ovarian follicle number and serum AMH aggregate with the markers of hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:4399-4405.

- 14) Jonard S, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Pigny P, Decanter C, Dewailly D. Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles? *Hum Reprod* 2003; 18:598-603.
- 15) Conover WJ, Iman RL. Analysis of covariance using the rank transformation. *Biometrics* 1982; 38:715-724.
- 16) Bablok W, Passing H. Application of statistical procedures in analytical instruments. *J Automat Chem* 1985; 7:74-79.
- 17) Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993; 39:561-577.
- 18) The 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* 2004; 19:41-47.
- 19) Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W et al. Androgen excess society. Positions statement: criteria for defining PCOS as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:4237-45.
- 20) Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, Escobar-Morreale HF. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update* 2014; 20:334-52.
- 21) Catteau-Jonard S, Bancquart J, Poncelet E, Lefebvre-Maunoury C, Robin G, Dewailly D. Polycystic ovaries at ultrasound: normal variant or silent polycystic ovary syndrome? *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012; 40:223-229.
- 22) O'Reilly MW, Taylor AE, Crabtree NJ, Hughes BA, Capper F, Crowley RK, Stewart PM, Tomlinson JW, Arlt W. Hyperandrogenemia predicts metabolic phenotype in polycystic ovary syndrome: the utility of serum androstenedione. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:1027-1036.
- 23) Gassner D, Jung R. First fully automated immunoassay for AMH. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52:1143-1152.

Table 1: Main clinical, hormonal and U/S data in Controls and PCOS Patients

	Controls (n=66)		PCOS (n=60)		p
	<i>Median</i>	<i>(Min-Max)</i>	<i>Median</i>	<i>(Min – Max)</i>	
Age (yrs)	28.0	(20.0 - 34.0)	27.0	(19.0 – 34.0)	NS
BMI	24.1	(16.0 – 42.0)	28.4	(18.0 – 47.0)	0.025
T (ng/ml)	0.21	(0.10 – 0.50)	0.43	(0.20 – 0.90)	0.0001
A (ng/ml)	1.22	(0.64 – 2.05)	2.07	(0.82 – 5.71)	0.0001
AMH AL-105i (pmol/l)	20.4 ^{a,c}	(6.1 – 58.0)	49.1 ^{a,c}	(8.4 – 187.5)	0.0001
AMH Gen II (pmol/l)	28.7 ^{b,c}	(11.4 – 82.8)	72.5 ^{b,c}	(14.7 – 238.8)	0.0001
EIA AMH/MIS (pmol/l)	32.9 ^{a,b}	(11.5 – 73.0)	77.1 ^{a,b}	(22.7 – 282.8)	0.0001
LH (IU/L)	3.8	(1.1 – 9.9)	4.8	(0.5 – 15.4)	0.0001
FSH (IU/L)	5.2	(3.0 – 9.0)	4.4	(2.7 – 7.2)	0.0001
VO (ml)	5.0	(2.3 – 13.7)	9.2	(3.7 – 30.0)	0.0001
FNPO	16.0	(6.0 – 40.0)	28.8	(12.0 – 56.0)	0.0001

^a: significantly different from AMH Gen II

^b: significantly different from AMH AL-105i

^c: significantly different from EIA AMH/MIS

Table 2: Correlation coefficients between each variable and the discriminant score obtained in control group (n=66) by cluster analysis including AMH values generated with either EIA AMH/MIS, Gen II or AL-105i assay.

Variables	AMH/MIS	Gen II	AL-105i
Age	0.04	0.07	0.00
T	0.18	0.12	0.17
A	0.48	0.33	0.38
LH	-0.10	0.08	0.21
FSH	-0.22	-0.12	-0.03
OV	0.40	0.46	0.26
FNPO	0.69	0.86	0.76
AMH	0.96	0.94	0.94

Table 3: Comparison of control subgroups IA and IB according to AMH assay-specific cluster analysis.

CLUSTERS EIA/MIS	GROUP IA (n=45)		GROUP IB (n=21)		p value
	Median	(Min-Max)	Median	(Min-Max)	
AGE (yrs)	28.0	(20-34)	28,0	(21-33)	NS
BMI	23.0	(16-40)	26.5	(16-42)	NS
T (ng/ml)	0.19	(0.06-0.48)	0.24	(0.06-0.49)	NS
A (ng/ml)	1.09	(0.64-2.05)	1.32	(0.91-1.8)	0.0001
AMH EIA/MIS (pmol/l)	26.8	(11.5-43.1)	52.0	(43.8-73.0)	0.0001
LH (IU/L)	3.9	(1.1-9.9)	3.2	(2.3-8,0)	NS
FSH (IU/L)	5.4	(3.0-9.0)	4.8	(3.5-7.6)	NS
OV (ml)	4.7	(2.3-13.7)	6.4	(3.4-11.7)	0.008
FNPO	13.0	(5.5-28.5)	20.0	(14.5-40.0)	0.0001
CLUSTERS Gen II	GROUP IA (n=54)		GROUP IB (n=16)		
	Median	(Min-Max)	Median	(Min-Max)	
AGE (yrs)	28.0	(20.0-34.0)	27.5	(22.0-32.0)	NS
BMI	23.2	(16.0-42.0)	26.0	(16.0-38.0)	NS
T (ng/ml)	0.19	(0.06-0.49)	0.23	(0.15-0.45)	NS
A (ng/ml)	1.15	(0.64-2.05)	1.31	(0.97-1.63)	0.007
AMH EIA/MIS (pmol/l)	25.7	(11.4-44.5)	53.4	(39.9-82.8)	0.0001
LH (IU/L)	3.7	(1.1-9.9)	3.9	(2.3-8.0)	NS
FSH (IU/L)	5.3	(3.0-9.0)	5.1	(3.5-7.6)	NS
OV (ml)	4.8	(2.3-13.7)	7.8	(3.4-11.7)	0.006
FNPO	14.0	(5.5-24.5)	26.7	(16-40)	0.0001
CLUSTERS AL-105	GROUP IA (n=57)		GROUP IB (n=13)		
	Median	(Min-Max)	Median	(Min-Max)	
AGE (yrs)	28.0	(20.0-34.0)	27.0	(22.0-32.0)	NS
BMI	24.0	(16.0-42.0)	25.5	(16.0-38.0)	NS
T (ng/ml)	0.20	(0.1-0.5)	0.25	(0.15-0.45)	NS
A (ng/ml)	1.18	(0.64-2.05)	1.36	(0.97-1.80)	0.004
AMH EIA/MIS (pmol/l)	17.5	(6.1-32.3)	44.3	(27.2-58.0)	0.0001
LH (IU/L)	3.4	(1.1-9.9)	4.1	(2.8-8.0)	NS
FSH (IU/L)	5.2	(3.0-9.0)	5.3	(4.0-6.5)	NS
OV (ml)	5.0	(2.3-13.7)	6.3	(3.4-11.7)	NS
FNPO	15.0	(5.5-27.5)	26.0	(14.5-40.0)	0.0001

Table 4: Results of the ROC analysis using populations made of PCOS patients and different subgroups IA.

	AUC	Standard Error	Asymptotic Significance	Asymptotic Confidence Interval at 95 %		Threshold pmol/L (ng/ml)	Sensitivity	Specificity
EIA/MIS ^a	.988	.010	p<0.0001	.968	1.000	41 (5.7)	96.7%	97.8%
Gen II ^a	.967	.017	p<0.0001	.934	1.000	44 (6.2)	86.7%	98.0%
Gen II ^b	.977	.015	p<0.0001	.947	1.000	39.5 (5.5)	91.7%	97.8%
AL-105i ^a	.949	.021	p<0.0001	.909	.989	32 (4.5)	75.0%	98.1%
AL-105i ^b	.963	.019	p<0.0001	.926	.999	32 (4.5)	75.0%	97.8%

^a: using assay-specific control group IA

^b: using control group IA derived from cluster analysis including the EIA AMH/MIS values

Figure 1: Correlation between three commercial immunoassays for the determination of AMH in the serum (Passing and Bablok regression procedure) (16).

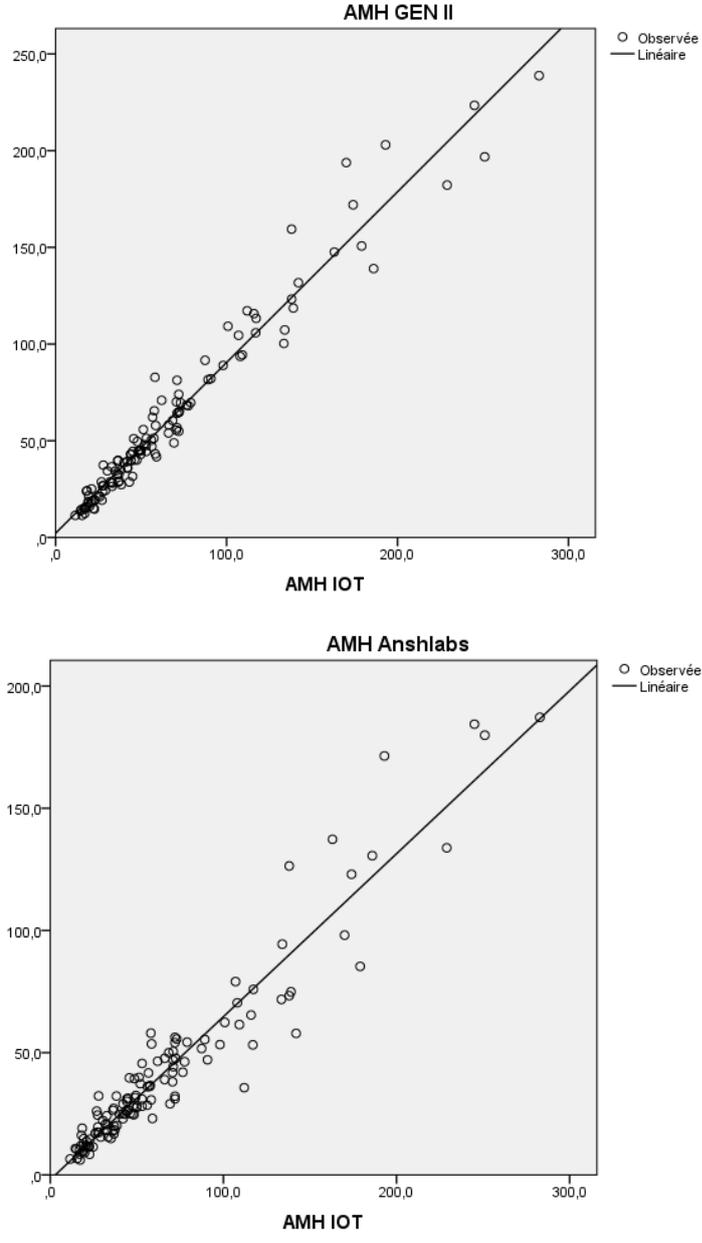
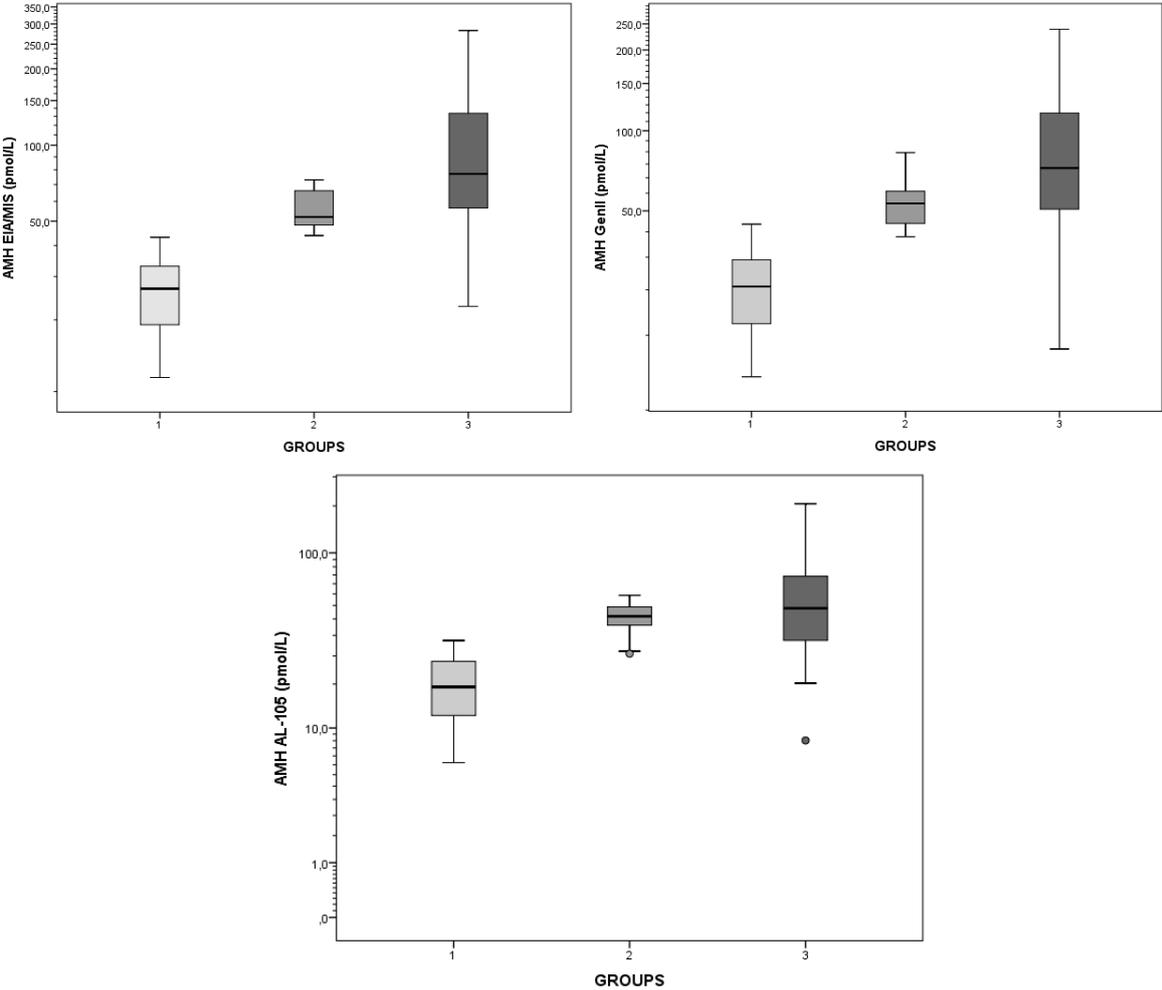


Figure 2: Box and whisker plots showing the values of serum AMH with each assay in the 3 subgroups of patients: group 1= “true” controls; group 2= controls with PCO-L; group 3= genuine PCOS.

Horizontal small bars represent the 5th-95th percentile range, and the boxes indicate the 25-75th percentile range. The horizontal line in each box corresponds to the median.

The dotted horizontal line indicates the optimal serum AMH threshold distinguishing true controls from patients with genuine PCOS (data from ROC analysis).



**5. ARTICLE 2: DOSAGE DE LA DELTA 4 ANDROSTENEDIONE AVEC LC-MS/MS:
COMPARAISON AVEC RIA ET INTERET POUR LE DIAGNOSTIC DU SYNDROME DES
OVAIRES POLYKYSTIQUES.**

DETERMINATION OF SERUM DELTA 4 ANDROSTENEDIONE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY: COMPARISON WITH THE RADIOIMMUNOASSAY AND INTEREST IN THE DIAGNOSIS OF POLYCYSTIC OVARY SYNDROME.

Elise GORISSE¹, Amjad GHULAM²; Bodalé DJOBO ², Pascal PIGNY ² and Didier DEWAILLY³.

¹ CHU de Nantes, Faculté de Médecine de Nantes France.

² Laboratoire de Biochimie & Hormonologie, Centre de Biologie Pathologie, CHRU, F-59037 Lille cedex France

³ Service de Gynécologie Endocrinienne et Médecine de la Reproduction, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU, F-59037 Lille cedex France

Authors Disclosure Statement: EG, AG, BD, PP and DD have nothing to declare.

Structured Abstract:

STUDY QUESTION: Does the determination of serum delta 4 androstenedione (A) by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) yield different results than the radioimmunoassay (RIA)? What are the performance of both assays for the diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS) compared to that of total testosterone (T) and Anti-Müllerian Hormone (AMH)?

SUMMARY ANSWER: The A values were moderately lower with LC-MS/MS, but they were highly correlated to those obtained by RIA. Both techniques offered excellent sensitivity and specificity for distinguishing normal women from patients with full-blown PCOS, greater than with the T radioimmunoassay and similar to those with the AMH immunoassay.

WHAT IS KNOWN ALREADY? LC-MS/MS improves the sensitivity and reproducibility of determination of serum steroid concentrations. The possibility of multiplex assays is also a major asset. From January 2015, the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism requires its use for any report involving steroid assays. For the A assay, little is known about its threshold value defining hyperandrogenism. This is particularly relevant for the diagnosis of PCOS to which the biological markers of hyperandrogenism contribute poorly so far.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION: Retrospective comparative analysis of data prospectively collected between 2012 and 2014 in 89 patients. The clinical, hormonal and ultrasonographic assessment was conducted in early follicular phase 2 to 5 days after spontaneous or progestin-induced menstruations in Controls and PCOS patients, respectively.

PARTICIPANTS/MATERIEL, SETTING, METHODS: 40 control patients (regular cycles, no hyperandrogenism) and 49 PCOS patients with both oligo-anovulation and clinical and/or biological hyperandrogenism were included. The A values were determined by both techniques (RIA and LC-MS/MS) on the same serum sample. Serum T and AMH were measured by RIA and Immunotech assay (Beckman-Coulter), respectively.

MAIN RESULTS AND THE ROLES OF CHANCE: In the whole set of subjects (n=89), the A values provided by LC-MS/MS and RIA were highly correlated ($r=0.898$, $p<0.0001$). However, LC-MS/MS yielded lower values than RIA (Passing-Bablok regression: LC-MS/MS=0.78 RIA + 0.12). The 95th percentile of the control population was 1.79 ng/ml and 1.95 ng/mL, respectively. A “super-control” group (n=25) was constituted after cluster analysis allowing non-subjective exclusion of 15 normal women with PCO-like features. ROC analysis challenging this subgroup to the PCOS group yielded similar AUC_{ROC} for A by LC-MS/MS, A by RIA and AMH (0.97, 0.98, 0.985, respectively), greater than the AUC_{ROC} for T (0.93). The thresholds offering the best compromise between sensitivity and specificity were 1.70 ng/ml and 1.94 ng/ml for A by LC-MS/MS and RIA, respectively.

LIMITATIONS, REASON FOR CAUTION : Retrospective study with a small sample size of 89 patients. Only patients with the full-blown PCOS phenotype were included. T was measured only by RIA. Free androgen index (FAI) was not tested.

KEYS WORDS : Androstenedione, PCOS, LC-MS/MS

INTRODUCTION

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), première cause d'hyperandrogénie (HA) (1), est une pathologie endocrinienne fréquente affectant plus de 10 % des femmes en âge de procréer (2). Initialement décrit en 1935 par Stein et Leventhal (3), son origine génétique est complexe et son expression phénotypique serait fortement liée à de multiples facteurs environnementaux.

L'HA, observée chez 70% des patientes SOPK (4), prend place intégrante dans la classification (5) et la physiopathologie de ce syndrome. Elle reste néanmoins de diagnostic délicat tant par la subjectivité clinique du score de Ferriman et Gallwey, que par l'absence de marqueur unique et de seuils référencés. En pratique clinique, la testostérone (T) totale est recommandée en première intention pour la définition de l'HA biologique (6). Le dosage de delta 4 androstènedione (A) n'est aujourd'hui préconisé qu'en seconde intention en cas de valeurs de T élevées. Cependant interprétée seule, une T totale normale pourrait amener à considérer, à tort, comme témoins certaines patientes présentant un SOPK (7)(8). Cette discordance peut être en lien avec une sensibilité et spécificité limitées du dosage de T totale (9). Bien que peu d'équipes l'utilisent de façon systématique du fait de trop faibles données normatives, l'A semble de plus avoir un intérêt pronostic prédictif de phénotypes plus sévères avec davantage de risques métaboliques (7). Précurseur de la T et de l'estrone, l'A est secrétée par les cellules thécales de l'ovaire (10)(11) et par la zone fasciculée des surrénales.

Pendant de nombreuses années la technique d'immunodosage (IA) a été largement utilisée et définie comme méthode performante et robuste pour le dosage des stéroïdes et a fortiori de l'A. Cependant elle possède certains inconvénients la rendant critiquable sur différents points: 1) une réactivité croisée avec certains anticorps pouvant altérer sa spécificité 2) une interférence avec la matrice, 3) une faible reproductibilité expliquée par la variabilité inter opérateur et des concentrations hormonales pouvant varier selon le kit utilisé. Parmi les IA, la technique de radio immunodosage (RIA) s'est développée dans les années 1950, initialement pour quantifier l'œstradiol. Son utilisation s'est par la suite élargie à l'ensemble

des stéroïdes mais nécessite de grands volumes et des étapes de lavages successifs diminuant ainsi son rendement. De plus en plus de laboratoires modulent leurs pratiques pour tendre à n'utiliser que la spectrométrie de masse. Le JCEM (Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism) dans une récente publication, précise que tous les articles scientifiques doivent présenter leurs résultats stéroïdiens en spectrométrie de masse depuis janvier 2015 (12).

La technique de spectrométrie de masse, fut introduite dans les années 60 associée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) reconnue initialement comme le gold standard, mais très consommatrice de temps. La GC-MS laisse place aujourd'hui à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), fiable, sensible, et reproductible, qui permet des dosages stéroïdiens successifs sur un même prélèvement, et ne souffre d'aucune réactivité croisée (13)(14).

Cette technique très spécifique, utilisée tant dans le domaine de la recherche qu'en pratique clinique, reste malgré ces avantages, une technique onéreuse et impose un investissement matériel important. Devant la légitimité de son utilisation, et de sa standardisation, il apparaît essentiel de l'étudier pour la définition de l'HA biologique chez les patientes SOPK et d'établir des valeurs de référence.

L'objectif principal de cette étude est de comparer les performances des deux techniques de dosage de l'A : LC-MS/MS et RIA pour le diagnostic de SOPK et d'établir les valeurs seuils propres à chaque technique.

Notre second objectif est de comparer ces performances à celles de la T totale et de l'AMH plasmatiques pour le diagnostic de SOPK.

MATERIELS ET METHODES.

89 patientes ont été incluses et divisées en deux groupes : un groupe contrôle (n= 40) ne présentant ni HA (clinique ou biologique) ni troubles du cycle, et un groupe SOPK (n=49) avec HA clinique et/ou biologique associée à une oligo-anovulation selon la classification du National Institutes of Health (NIH) (15). Les informations ont été obtenues à partir d'une base de données informant sur des critères cliniques, hormonaux et échographiques recueillis prospectivement entre 2012 et 2014. Ces patientes avaient été adressées dans le service d'hospitalisation de jour de gynécologie endocrinienne du CHRU de Jeanne de Flandres à LILLE pour l'exploration d'une HA et/ou d'un trouble du cycle et/ou d'une pathologie tubaire et/ou pour infertilité d'origine masculine. Les patientes ayant une infertilité inexplicée ou une endométriose avaient été exclues de l'étude. Le bilan clinique hormonal et échographique était réalisé en début de phase folliculaire entre le 2ème et le 5ème jour du cycle inclus. En cas d'oligo-spanioménorrhée, les dernières règles étaient soit spontanées soit déclenchées par dydrogesterone (10 mg/jour pendant 7 jours).

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique de recherche de l'hôpital universitaire de Lille. Toutes les patientes ont donné leur consentement avant l'inclusion dans l'étude.

Les critères d'exclusion étaient un âge inférieur à 18 ans ou supérieur à 35 ans, la suspicion d'une réserve ovarienne basse (FSH >12 IU/L et/ou un compte de follicules antraux (CFA) par ovaire <6 et/ou un volume ovarien (VO) <2.3 ml), une hyperprolactinémie (prolactine >20 ng/ml sur deux prélèvements différents), ou un bloc en 21 hydroxylase (17 hydroxyprogesterone (OHP) de base >5 ng/ml et/ou >12 ng/ml après un test au Synacthène). Les tumeurs ovariennes et surrénaliennes étaient suspectées lorsque la T ou le sulfate déhydroépiandrostérone (DHA-S) étaient dosés supérieurs à 1.5 ng/ml ou 15 µmol/l respectivement. Toute patiente présentant des critères d'aménorrhée hypothalamique était

également exclue, tout comme celle ayant un follicule supérieur à 9 mm de diamètre lors de l'échographie pelvienne de début de cycle ou un taux d'œstradiol supérieur à 80 pg/ml.

C'est au cours d'un examen clinique en hospitalisation de jour, que les patientes étaient interrogées spécifiquement sur la durée de leurs cycles et les signes cliniques d'HA. Une oligoménorrhée est définie par une durée du cycle supérieure à 35 jours ou une aménorrhée complète. L'HA clinique pouvait s'identifier par un hirsutisme (score de Ferriman et Gallwey supérieur à 6) et/ou une acné localisée sur plus de deux zones corporelles. Par ailleurs, des valeurs de T totale >0.5 ng/ml et/ou d'A >2.02 ng/ml (RIA) définissaient initialement une HA à l'inclusion selon rapporté précédemment (16). L'A dosée par la technique LC-MS, n'a pas été utilisée comme critère d'HA.

Les taux plasmatiques de prolactine, LH, FSH, E2, 17-OHP, DHAS, et T ont été mesurés par immunodosage. Pour toutes les patientes, le compte des follicules antraux par ovaire (CFA) et le volume ovarien (VO) étaient réalisés avec un échographe Voluson E8 Expert (General Electric, VELIZY, France) à l'aide d'une sonde endovaginale de fréquence 5-9 MHz. L'immunodosage de l'hormone antimüllérienne (AMH) a été réalisé avec la trousse EIA AMH/MIS selon rapporté précédemment (16).

Procédure de la technique RIA :

L'A a été dosée par radio immunodosage RIA utilisant un kit fourni par Beckman Coulter. Le dosage avait été réalisé le jour même du prélèvement sanguin.

La technique de radio-immunodosage est un dosage par compétition.

La limite de détection était de 0.04 ng/ml. Les coefficients de variation intra et inter dosage étaient de 10.1% et 14.6% respectivement.

Procédure de la technique LC-MS/MS :

Le dosage LC-MS/MS a été réalisé à partir de prélèvements sanguins cryo préservés dans une sérothèque à une température de -80°C .

La méthode modifiée de Robin Haring a été utilisée. La delta 4 androstènedione et l'androstènedione- d7 (IS-AD) ont été extraits en utilisant une technique d'extraction liquide-liquide avec le methyl- tert- butyl-ether (1ml). Les analytes ont ensuite été séparés par Ultra-Performance™ liquid chromatography (UPLC) sur le système Waters ACQUITY UPLC™ avec une colonne d'1.7 μM d'activité UPLC BEH C18. Les éluats étaient monitorés par le détecteur Water Quattro Premier™ de spectrométrie de masse quadripôle en tandem fonctionnant en mode MRM (suivi de réactions multiples). La transition en charge unique Q1/Q3 est 287.1/96.6 et 296.0/99.7 pour la delta 4 androstènedione et l'androstènedione-d7 (IS-AD) respectivement.

L'extrait dosé est ensuite replacé sur une courbe d'étalonnage. Les données étaient récupérées par MassLynx™ lié directement au spectromètre de masse quadripôle en tandem Waters Quattro Premier.

La zone de linéarité est de 0.13 à 4 ng/ml. Les limites de détection et de quantification sont de 0.04 et 0.09 ng/ml respectivement. Les coefficients de variation intra et inter-dosage sont inférieurs à 10%.

L'analyse statistique :

Pour décrire la population étudiée, les résultats sont exprimés en médiane avec les 5^{ème} et 95^{ème} percentiles. Le test non paramétrique de Mann Whitney a été utilisé pour la comparaison des deux groupes.

Une procédure de régression par Passing Bablok (17) a permis d'évaluer la corrélation des deux techniques de dosage de l'A.

Une partie de l'analyse a nécessité l'exclusion des OPK asymptomatiques (PCOM) de la population contrôle à l'aide d'une analyse par cluster (18). Cette méthode statistique est utilisée pour classer des individus dans différents groupes homogènes selon leur similarité pour des variables sélectionnées. Elle se base sur la méthode des k-moyennes (k-means) dans laquelle la similitude entre les individus est mesurée par la distance euclidienne. L'homogénéité de chaque cluster a été évaluée par le R^2 (Square correlation ratio). De plus, la valeur du R^2 de chaque variable a permis de déterminer leur importance relative pour l'identification des clusters.

La classification par clusters utilisée dans ce travail est issue de l'analyse réalisée pour l'étude comparative de trois techniques de dosage de l'AMH (*Pigny et al en cours de publication*). Les résultats sont présentés Figure 1. Pour des raisons de disponibilité de sérum, le groupe contrôle initialement constitué de 66 patientes dans la précédente étude, n'est ici composé que de 40 patientes (dont 25 issues du groupe de 45 vraies témoins, et 15 issues du groupe de 21 patientes PCOM). Les variables, considérées comme marqueurs de PCOM, incluses dans l'analyse par cluster sont: CFA, VO, AMH, LH, T et A. L'âge pouvant constituer un facteur confondant a également été intégré.

Des courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) ont été construites pour étudier les performances diagnostiques des deux techniques de dosage de l'A, mais également celles de la T totale et de l'AMH (19). Les aires sous la courbe (ASC) obtenues représentent la probabilité d'identifier correctement les patientes témoins et les SOPK.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à partir du logiciel SPSS 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) et Med Calc (version 14.12.0). $P < 0.05$ était considéré comme statistiquement significatif.

RESULTATS

Les patientes des deux groupes avaient un âge et un BMI similaires. Les caractéristiques clinico-biologiques sont rappelées dans le tableau 1.

Les deux techniques de dosage apparaissent fortement corrélées ($r=0.898$, $p<0.0001$). Toutefois les valeurs d'A sont plus basses avec la technique LC-MS/MS qu'avec la RIA, selon la formule de régression par la méthode de Passing-Bablok : $LC-MS/MS = 0.78 RIA + 0.12$ (Figure 2).

Une analyse en courbes ROC a été réalisée sur cet échantillon ($n=89$) afin d'analyser la sensibilité et la spécificité des deux techniques pour distinguer les patientes contrôles des patientes SOPK.

Comme le montre le tableau 2 et la figure 3, les ASC pour RIA et LC-MS/MS étaient superposables ($p=0.967$). En revanche, elles étaient toutes les deux significativement supérieures à celle de la T totale ($p=0.02$), de l'AMH ($p=0.03$) et du CFA ($p=0.002$).

Nous avons déterminé les seuils respectifs d'A permettant de distinguer les deux groupes. Au regard des résultats des courbes ROC, le meilleur compromis entre spécificité (95%) et sensibilité (94%) fut obtenu pour une valeur de 1.94 ng/ml avec RIA. Pour une sensibilité de 91% et une spécificité de 95% le seuil de 1.70 ng/ml a été retenu avec LC-MS/MS. A titre comparatif, le 95^{ème} percentile de la population contrôle était de 1.95 ng/ml pour RIA et de 1.79 ng/ml pour LC-MS/MS.

La supériorité des courbes ROC pour l'A était prévisible pour la T totale mais surprenante pour l'AMH qui est actuellement considérée comme un excellent biomarqueur de SOPK (20). Néanmoins, le groupe contrôle initial incluait des patientes PCOM dont l'AMH est plus élevée. Afin de les isoler, nous avons choisi de réitérer l'étude en tenant compte de l'analyse par cluster réalisée antérieurement par *Pigny et al en cours de publication* (Figure 1).

Ainsi, au sein de notre groupe contrôle (n=40), 25 patientes étaient des vraies témoins et 15 étaient des OPK asymptomatiques (PCOM) appartenant respectivement aux clusters 1 et 2 de la population contrôle initiale. Les 15 patientes PCOM ont alors été exclues.

Une nouvelle analyse en courbes ROC a ensuite été réalisée sur 74 patientes (25 contrôles et 49 SOPK). L'ASC pour les deux techniques de dosage d'A restait très satisfaisante (Tableau 3). En revanche pour l'AMH, l'ASC était nettement améliorée. Face aux résultats comparables des performances diagnostiques des techniques de dosage de l'A, quel que soit l'effectif du groupe contrôle, nous avons choisi de poursuivre l'analyse sur l'ensemble de la population incluse au départ (n=89).

Les résultats des tests de corrélations non paramétriques de l'A sur l'ensemble des patientes (n=89) mettent en évidence une corrélation positive de l'A avec la T, la 17OHP, l'AMH, la LH et le CFA quelle que soit la technique de dosage utilisée. Néanmoins l'A, tout comme l'AMH, n'est corrélée ni au BMI ni à l'insulinémie (Tableau 6). Comparativement, les corrélations de la T totale sont plus faibles et ce paramètre demeure significativement corrélé au BMI et à l'insulinémie (Tableau 6).

Enfin, pour étudier la capacité de l'A à discriminer les «vraie témoins» des OPK asymptomatiques (PCOM) une analyse restreinte au groupe contrôle a été entreprise (Tableau 5). L'ASC était similaire quelle que soit la technique de dosage de l'A utilisée. Comparativement, il apparaît évident que l'AMH a ici un pouvoir discriminant absolu. En effet, la T et l'A, montrent des ASC significativement plus basses que celle de l'AMH (p=0.001 et p= 0.005 respectivement).

DISCUSSION

Premièrement notre étude rétrospective indique des valeurs modérément plus basses en dosage LC-MS/MS qu'en RIA, de façon cohérente avec les résultats de précédentes publications (21). Cette différence semble être liée à l'existence de réactivités croisées, et d'interactions anticorps antigènes en présence de la matrice en immunodosage (22)(9). Les techniques RIA et LC-MS/MS, pour le dosage de l'A, sont toutes les deux de bons tests, aux performances équivalentes, pour le diagnostic de SOPK. Le fait de n'étudier que les « vraies témoins », après l'analyse par cluster, ne modifie en rien ces résultats. Nos résultats sont en faveur de l'A comme marqueur biologique pour la définition de l'HA. En revanche l'AMH reste le meilleur marqueur biologique pour différencier au sein du groupe contrôle, les « vraies témoins » des OPK asymptomatiques (PCOM) (23).

Au vu des résultats, nous proposons les valeurs de 1.70 ng/ml en LC-MS/MS et 1.94 ng/ml en RIA comme seuils d'A pour définir l'HA biologique du SOPK. Ces résultats se rapprochent des seuils établis précédemment :

- seuil de 2.02 ng/ml en RIA correspondant au 95^{ème} percentile dans une autre population du service de Jeanne de Flandre au CHRU de Lille. Cette différence de 5% reste cependant négligeable et n'a donc pas pu perturber la classification initiale des patientes.
- Pour la méthode LC-MS/MS, à ce jour encore peu d'études ont proposé leurs normes. Notre seuil de 1.80 ng/ml reste néanmoins proche des intervalles de référence proposés par Haring et al (24) et Barth JH et al (25).

De façon cohérente avec les travaux de Janse F et al (26), notre étude montre ici que la performance de la technique LC-MS/MS n'est pas supérieure à RIA pour le diagnostic de SOPK. Cependant les avantages en pratique de la spectrométrie de masse (dosages multiplex, reproductibilité et spécificité optimales) nous autorisent à privilégier cette technique en pratique clinique.

Le dosage RIA a été réalisé initialement sur des prélèvements effectués le jour même, alors que le dosage LC-MS/MS a été réalisé pour la majorité des patientes sur des tubes cryopréservés à -80°C dans une sérothèque. Cette différence reste néanmoins sans conséquence pour l'interprétation des résultats puisque de précédentes études ont démontré la relative stabilité des stéroïdes après plusieurs années de congélation (27)(28)(29).

La performance diagnostique de l'A est supérieure à celle de l'AMH exclusivement lorsque l'analyse porte sur l'ensemble des patientes contrôles (n=89). Cette supériorité disparaît après exclusion des PCOM par l'analyse par cluster. Néanmoins, l'A montre dans ce cas de façon surprenante, des ASC très proches de celles de l'AMH. Contrairement à l'AMH, l'A a la particularité de ne pas être influencée par la présence ou non de PCOM au sein du groupe témoin.

Dans notre travail, l'A possède un fort pouvoir discriminant pour distinguer les patientes du groupe contrôle des patientes SOPK. Cela est certainement lié au fait que toutes les patientes SOPK incluses présentaient une HA clinique et/ou biologique. Il serait intéressant de réaliser une étude s'intéressant spécifiquement au phénotype OPK échographique + oligo-anovulation issu de la classification de Rotterdam, et particulièrement controversé. On peut supposer que le dosage de l'A serait ici nettement moins performant que celui de l'AMH qui reste sans doute le marqueur le plus constant des différents phénotypes du SOPK.

Lorsque nous l'avons comparé dans ce travail à la T totale, l'A demeure plus performante pour différencier les deux groupes. Ceci confirme son potentiel à devenir prochainement un marqueur valable à recommander en première intention pour la définition de l'HA biologique chez les patientes SOPK.

L'A ne semble pas, ici, être influencée par les facteurs métaboliques que sont le BMI et l'insulinémie, comme nous l'indiquent les tests de corrélation non paramétriques. Ce résultat est cohérent avec les travaux de Kiddy et al (30), et Moran et al (31). Cependant deux autres récentes études ont suggéré une corrélation négative entre l'A et le BMI chez les patientes SOPK (32)(33) (Tableau a). L'explication apportée par les auteurs serait une conversion plus élevée de l'A en estrone par l'aromatase chez les patientes obèses. Dans l'étude de Misichronis et al (33), l'obésité soit un $BMI > 30 \text{ kg/m}^2$, est associée à des valeurs d'A plus basses au sein de l'ensemble du groupe SOPK ($p < 0.001$), mais ne l'est pas pour les patientes au phénotype non hyperandrogénique. Dans l'étude de Georgopoulos et al (32), l'A est inversement corrélée au BMI ($p < 0.001$) chez l'ensemble des patientes SOPK ($n = 1276$). En revanche lorsqu'ils n'étudient que les patientes SOPK avec HA+OA (comme étudié dans notre travail) la significativité disparaît ($p = 0.332$).

Notre étude possède cependant quelques limites : l'effectif réduit de l'échantillon et l'analyse rétrospective sont deux biais qui ont pu diminuer sa puissance statistique.

La comparaison de l'A avec la T dans notre série, reste critiquable par le fait que la T totale ait été dosée avec la technique RIA. Il serait pertinent de réitérer son dosage avec la technique LC-MS/MS sur cette série. Par ailleurs nous n'avons pas étudié les valeurs de T libre par le calcul du Free Androgen Index (FAI).

En conclusion, notre étude démontre que les techniques RIA et LC-MS/MS offrent des performances similaires pour le diagnostic de SOPK avec des valeurs légèrement plus basses en spectrométrie de masse. Nous proposons la valeur de l'A de 1.70 ng/ml comme seuil de l'HA biologique distinguant les femmes normales des femmes SOPK. La standardisation des dosages des androgènes est une problématique actuelle. Chaque laboratoire fixe à ce jour ses propres valeurs de référence. A l'avenir, le dosage des androgènes pourrait être réalisé sur des prélèvements salivaires avec LC-MS/MS qui viendraient remplacer les méthodes actuelles. Les premiers résultats prometteurs pour le dosage de la testostérone ne sont néanmoins pas encore vérifiés dans le SOPK (34).

RÉFÉRENCES

- 1) Franks S. Polycystic ovary syndrome. *NEJM*.1995.333:853-61.
- 2) Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet* 2007; 370: 685-97.
- 3) Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 1935; 29:181-191.
- 4) Fauser B, Tarlatzis B, Rebar 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; 97: 28-38.
- 5) The Rotterdam ESHRE/ ASRM- Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004 Revised 2003 consensus on the diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81:19-25.
- 6) Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, Welt CK. Diagnosis and Treatment of Polycystic Ovary Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:4565-4592.
- 7) O' Reilly MW, Taylor AE, Crabtree NJ, et al, Hyperandrogenemia predicts metabolic phenotype in polycystic ovary syndrome the utility of serum androstenedione. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:1027-1036.
- 8) Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3078-3082.
- 9) Rosner W, Auchus RJ, Azziz R sluss PM, Raff H. Position statement utility, limitations and pitfalls in measuring testosterone an Endocrine Society Position Statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:405-413.
- 10) Gilling Smith C, Story H, Rogers V, Franks S. Evidence for a primary abnormality of thecal cell steroidogenesis in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Encocrinol Metab* 1997; 47:93-99.
- 11) Nelson VL, Legros RS, Strauss JF 3rd, McAllister JM. Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endocrinol* 1999; 13:946-957.
- 12) Handelsman DJ, Wartofsky L. Requirement for mass spectrometry sex steroid assays in the *Journal of Clinical Endocrinology and Métabolism*. *J Clin Endrinol Metab* 2013; 98:3971-3973.
- 13) Vogeser M, Parhofer KG. Liquid chromatography tandem mass spectrometry technique and application. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007; 115:559-570.
- 14) Shackleton C. Clinical Steroid mass spectrometry. A 45 year history culminating in HPLC-MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121:481-490.

- 15) Zawadzki JK et al. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome In: Givens JHF, Merriman G, editors. *The Polycystic ovary Syndrome*. Cambridge, MA: Blackwell Scientific 1992:377-384.
- 16) Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P et al. Diagnostic of polycystic ovary syndrome revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod* 2011; 26: 3123-3129.
- 17) Bablok W, Passing H. Application of statistical procedures in analytical instruments. *J Automat Chem* 1985; 7:74-79.
- 18) Hartigan JA. Statistical theory in clustering. *J Classif* 1985; 2:63-76.
- 19) Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993; 39:561-577.
- 20) Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, Griesinger G et al. The physiology and utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum reprod* 2014; 20:370-385.
- 21) Keefe CC, Goldman MM, Zhang K, Clarke N, Reitz RE, Welt CK. Simultaneous Measurement of Thirteen Steroid Hormones in Women with Polycystic Ovary Syndrome and Control Women Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Édité par Elizabeth Wilson. *PLoS ONE*. 2014; 9:e93805.
- 22) Bruce SJ, Rey F, Béguin A, Berthod C, Werner D, et Henry H. Discrepancy between Radioimmunoassay and High Performance Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry for the Analysis of Androstenedion. *Anal Biochem* 2014; 455:20-25.
- 23) Pigny P, Jonard S, Robert Y, et 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; 91: 941-945.
- 24) Haring R, Hannemann A, John U, Radke D, Nauck M, Wallaschofski, Owen L et al. Age-Specific Reference Ranges for Serum Testosterone and Androstenedione concentrations in Women Measured by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 2: 408-415.
- 25) Barth JH, Field HP, Yasmin E, Balen AH: Defining hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome: measurement of testosterone and androstenedione by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and analysis by receiver operator characteristic plots. *Eur J Endocrinol/Eur Fed Endocr Soc* 2010; 162:611-615.
- 26) Janse F, Eijkemans MJ, Goverde AJ, Lentjes EG, Hoek A, Lambalk CB et al. Assessment of Androgen Concentration in Women: Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Extraction RIA Show Comparable Results. *Eur J Endocrinol* 2011; 165:925-933.
- 27) Kley HK, Schlaghecke R, Kruskemper HL. Stability of steroids in plasma over a 10 years period. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1985; 23:875-878.
- 28) Kley HK, Rick W. The effect of storage and temperature on the analysis of steroids in plasma and blood. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984; 5:371-378.

- 29) Wickings EJ, Nieschlag E. Stability of testosterone and androstenedione in blood and plasma samples. *Clin Chim Acta* 1976; 71:439-443.
- 30) Kiddy DS, Sharp PS, White DM, Scanlon MF, Mason HD, Bray CS, et al. Differences in clinical and endocrine features between obese and non-obese subjects with polycystic ovary syndrome: an analysis of 263 consecutive cases. *Clin Endocrinol* 1990; 32:213–220.
- 31) Moran C, Renteria JL, Moran S, Herrera J, Gonzalez S, Bermudez JA. Obesity differentially affects serum levels of androstenedione and testosterone in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2008; 90:2310–2317.
- 32) Georgopoulos NA, Papadakis E, Armeni AK, Katsikis I, Roupas ND, Panidis D. Elevated serum androstenedione is associated with a more severe phenotype in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hormones (Athens)*.2014; 13:213-221.
- 33) Misichronis G, Georgopoulos NA, Marioli DJ et al. The influence of obesity on androstenedione to testosterone ratio in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) and hyperandrogenemia. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28:249-252.
- 34) Keevil B, MacDonald P, Macdowall W, Lee DM, Wu FC; NATSAL Team. Salivary testosterone measurement by liquid chromatography tandem mass spectrometry in adult males and females. *Ann Clin Biochem*. 2013; 51:368-378.

Tableau 1 : Principales caractéristiques cliniques et biologiques des patientes contrôles et SOPK :

	Contrôles (n=40)		SOPK (n=49)		Valeurs de p
	Médiane (5 ^{ème}	95 ^{ème} percentile)	Médiane (5 ^{ème}	95 ^{ème} percentile)	
Age (années)	28,0	(21,1 33,0)	27,0	(21,0 33,5)	0.283
BMI (kg/m ²)	25,3	(17,8 40,0)	30,0	(18,4 44,0)	0.145
A LC-MS/MS (ng/ml)	1,25	(0,73 1,79)	2,10	(1,57 3,68)	0.0001
A RIA (ng/ml)	1,43	(0,79 1,95)	2,60	(1,60 4,83)	0.0001
AMH (pmol/l)	36,4	(15,6 71,0)	77,6	(39,6 240,0)	0.0001
T totale (ng/ml)	0,19	(0,07 0,48)	0,41	(0,18 0,81)	0.0001
SHBG (nmol/l)	48,4	(17,6 109,5)	33,7	(15,1 69,6)	0.002
17 OHP	0,40	(0,12 0,65)	0,67	(0,32 1,27)	0.0001
Insulinémie	3,0	(0,7 17,9)	5,5	(1,5 21,0)	0.012
LH (IU/L)	3,7	(1,3 8,1)	4,7	(1,2 12,9)	0.002
FSH (IU/L)	5,4	(3,3 8,6)	4,4	(2,9 6,7)	0.001
CFA	16,3	(6,6 40,0)	28,0	(15,3 55,3)	0.0001
OV (ml)	5,0	(2,9 10,3)	8,8	(5,1 24,1)	0.0001

Tableau 2 : Résultats de l'analyse ROC au sein de l'ensemble de la population étudiée (n=89).

	Zone sous la courbe	Erreur standard	Sig. asymptotique	Intervalle de confiance asymptotique à 95%	
A RIA	0,973 ^{a,b,c}	0,018	<0,0001	0.938	1.000
A LC-MS/MS	0,972 ^{a,b,c}	0.018	<0,0001	0.937	1.000
AMH	0,895	0,032	<0,0001	0.832	0.957
T totale	0.879	0.037	<0.0001	0.806	0.952
CFA	0.829	0.043	<0.0001	0.744	0.914

^a : Significativement différent de AMH,

^b : Significativement différent de T totale

^c : Significativement différent de CFA

Tableau 3 : Résultats de l'analyse ROC sur la population de « vraies témoins » et de SOPK (n=74).

	Zone sous la courbe	Erreur standard	Sig. asymptotique	Intervalle de confiance asymptotique à 95%	
A RIA	0,980	0,15	<0,0001	0.951	1.000
A LC-MS/MS	0.973	0.20	<0,0001	0.935	1.000
AMH	0.984	0.14	<0,0001	0.958	1.000
T Totale	0.926	0.032	<0.0001	0.862	0.989

Tableau 4 a : Valeurs de l'A avec les techniques de dosage RIA et LC-MS/MS selon les percentiles (n=40).

	Percentiles						
	5e	10e	25e	50e	75e	90e	95e
A RIA ng/ml	0.79	1.024	1.2	1.43	1.73	1.85	1.95
A LC-MS/MS ng/ml	0.73	0.80	1.045	1.24	1.385	1.567	1.79

Tableau 4b : Seuils de l'A d'après l'analyse en courbes ROC (n=89).

	Seuil ng/ml	Sensibilité	Spécificité
A RIA	1.94	94%	95%
A LC-MS/MS	1.70	91%	95%

Tableau 5 : Résultats de l'analyse ROC au sein du groupe contrôle (n= 40).

	Zone sous la courbe	Erreur standard	Sig. asymptotique	Intervalle de confiance asymptotique à 95%	
A RIA	0.799 ^a	0.072	0.002	0.658	0.940
A LC-MS/MS	0.793 ^a	0.072	0.002	0.653	0.934
AMH	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000
T Totale	0.751 ^a	0.078	0.009	0.598	0.903

^a: Significativement différent de AMH.

Tableau 6 : Coefficients de corrélation entre les valeurs d'A (RIA et LC-MS/MS), de T totale, d'AMH ; et les autres paramètres (n=89) :

Variables	A RIA	A LC-MS/MS	T totale	AMH
A RIA	1	0.901*	0.660*	0.569*
A LC-MS/MS	0.901*	1	0.617*	0.610*
T totale	0.660*	0.617*	1	0.508*
17 OHP	0.645*	0.653*	0.536*	0.415*
AMH	0.569*	0.610*	0.508*	1
LH	0.384*	0.439*	0.337*	0.318*
BMI	0.039	-0.21	0.326*	-0.007
Insulinémie	0.163	0.146	0.320*	0.039
CFA	0.600*	0.595*	0.499*	0.707*

**: La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral)*

Figure 1 : Analyse par cluster réalisée à partir de la population initiale de 66 patientes contrôles (*Pigny et al –article 1- en cours de publication*).

The FASTCLUS Procedure
Replace=FULL Radius=0 Maxclusters=2 Maxiter=1

Initial Seeds								
Cluster	AGE	Testo	AndroHPLC	LH	FSH	volmoy	FNPO	AMHIOTinitiale
1	27.00000000	0.06000000	1.28000000	2.40000000	6.20000000	3.45000000	7.50000000	11.50000000
2	27.00000000	0.39000000	1.24000000	5.50000000	6.50000000	3.44000000	36.00000000	73.00000000

Criterion Based on Final Seeds = 4.1876

Cluster Summary						
Cluster	Frequency	RMS Std Deviation	Maximum Distance from Seed to Observation	Radius Exceeded	Nearest Cluster	Distance Between Cluster Centroids
1	45	3.7966	17.6628		2	31.3776
2	21	4.9948	18.9298		1	31.3776

Statistics for Variables				
Variable	Total STD	Within STD	R-Square	RSQ/(1-RSQ)
AGE	3.41753	3.44313	0.000575	0.000575
Testo	0.10318	0.10243	0.029777	0.030691
AndroHPLC	0.28817	0.26375	0.175362	0.212653
LH	1.75262	1.76096	0.005998	0.006034
FSH	1.28856	1.27712	0.032789	0.033901
volmoy	2.30946	2.17667	0.125356	0.143323
FNPO	7.94107	6.40209	0.360041	0.562601
AMHIOTinitiale	16.47565	8.90259	0.712516	2.478451
OVER-ALL	6.68049	4.21195	0.608616	1.555038

Pseudo F Statistic = 99.52

Approximate Expected Over-All R-Squared = 0.58090

Cubic Clustering Criterion = 0.753

WARNING: The two values above are invalid for correlated variables.

Figure 2 : Comparaison des techniques UPLCMS/MS et RIA après régression par la méthode de Passing Bablok.

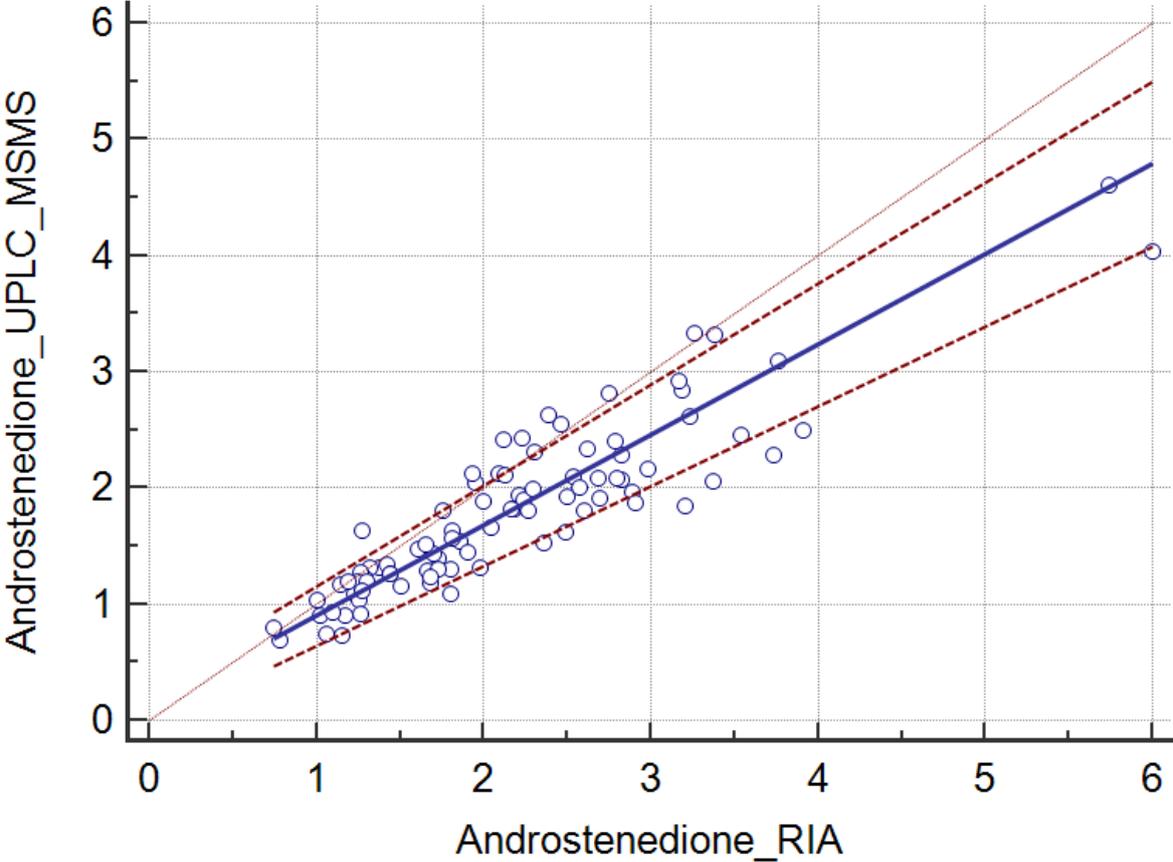
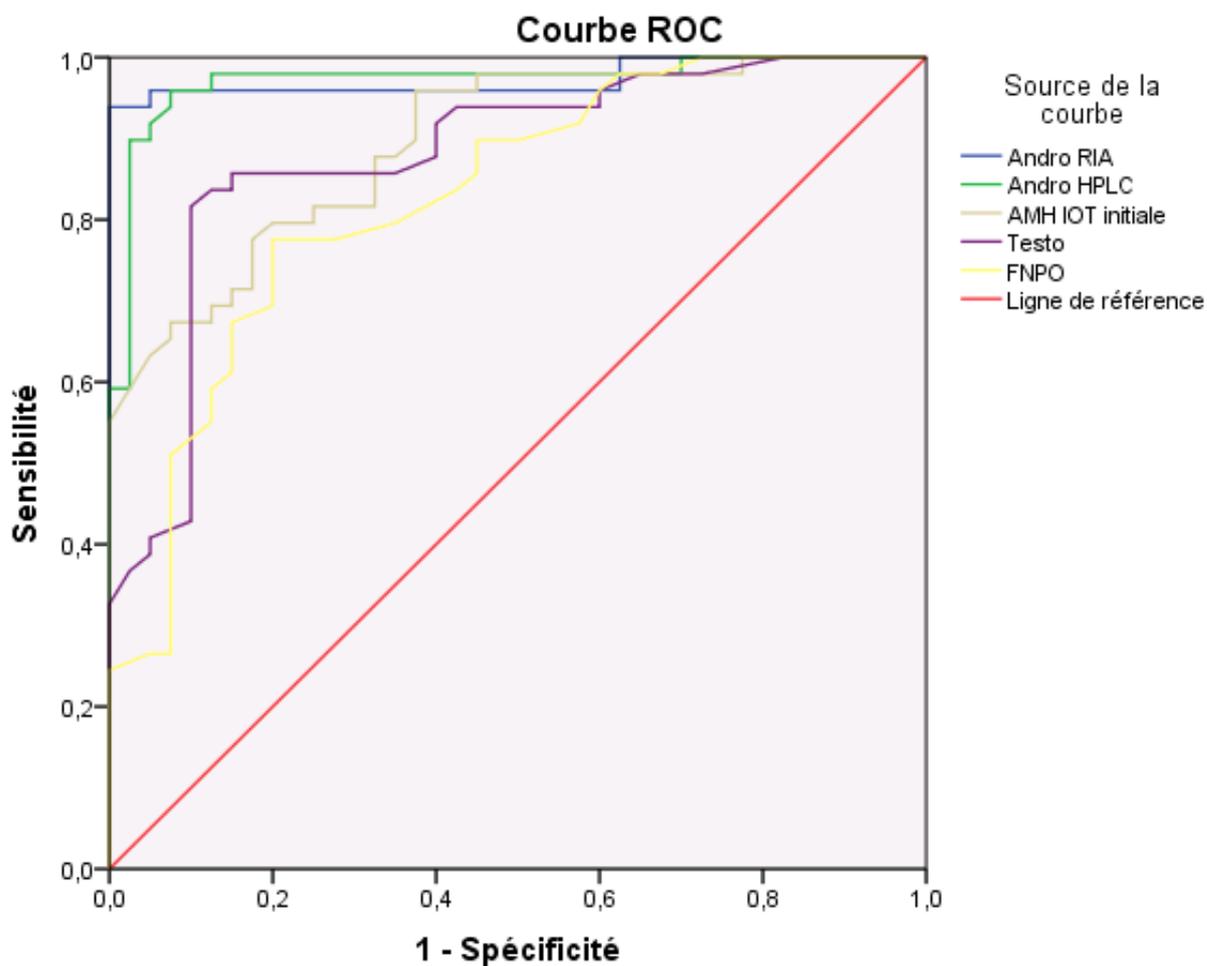


Figure 3 : Courbes ROC incluant l'ensemble de la population n=89 (contrôle versus SOPK).



Les segments diagonaux sont générés par les liens.

6. DISCUSSION

Le SOPK demeure une pathologie liée à la dysrégulation des cellules thécales d'une part, et des cellules de la granulosa d'autre part comme expliqué précédemment.

L'étude conjointe de la delta 4 androstènedione et de l'AMH nous a permis d'étudier les marqueurs spécifiques de cette double dysrégulation.

Nos résultats confirment la corrélation des techniques EIA AMH/MIS, Gen II et Anshlab. La technique Gen II apparaît aujourd'hui aussi performante que EIA AMH/MIS utilisée, elle, depuis plus longtemps.

Nous avons proposé le seuil d'AMH de 40 pmol/l (5.7 ng/ml) avec les techniques EIA AMH/MIS ou Gen II. De précédentes études ont proposé des seuils qui diffèrent selon l'effectif, les caractéristiques phénotypiques des patientes incluses, l'analyse par cluster réalisée ou non, et les techniques de dosages étudiées.

Le tableau ci-dessous rappelle les seuils proposés précédemment par différents auteurs, et la complexité à établir une valeur seuil universelle.

Seuils d'AMH proposés	Auteurs/ années	Techniques de dosage	Se %/ Sp%
35 pmol/l (4.9 ng/ml)	<i>Dewailly et al 2011</i>	EIA-AMH/MIS	92%/97%
28 pmol/l (3.9 ng/ml)	<i>Dewailly et al 2014</i>	Gen II (ancien protocole)	84%/97.5%
44 pmol/l (6.2 ng/ml)	<i>Rosenfield et al 2013</i>	Gen II (ancien protocole)	81%/95%
48 pmol/l (6.7 ng/ml)	<i>Homburg et al 2013</i>	Active MIS/AMH (DSL) + Gen II (ancien protocole)	60%/98.2%
33.5 pmol/l (4.7 ng/ml)	<i>Iliodromiti et al 2013</i>	EIA-AMH/MIS +DSL	83%/80%
20 pmol/l (2.8 ng/ml)	<i>Eilertsen et al 2012</i>	EIA AMH/MIS	95%/97%
33 pmol/l (4.6 ng/ml)	<i>Casadei et al 2013</i>	EIA-AMH/MIS	95%/95%

Une technique de dosage complètement automatisée, proposée par Roche, pourrait prendre une place importante dans le dosage de l'AMH. En 2014, *Gassner et al* l'ont comparé avec la technique Gen II chez 57 patientes. La corrélation était excellente avec un coefficient de corrélation à 0.98.

L'étude prospective multicentrique de *Anderson et al* publiée début 2015, confirme l'absence de variation de dosage entre les centres contrairement au CFA, et la forte corrélation entre l'AMH et le compte folliculaire.

La reproductibilité et la rapidité des dosages sont deux atouts majeurs de cette nouvelle technique. Il serait pertinent, dans la mesure du possible, de compléter notre étude avec les valeurs d'AMH obtenues avec cette technique de dosage totalement automatisée.

Pour le dosage de l'A, l'analyse des performances diagnostiques de la technique de spectrométrie de masse apparaissait légitime devant la généralisation de celle-ci pour tous les stéroïdes depuis janvier 2015 et « a fortiori » pour les prochaines études sur le SOPK.

Nous avons choisi de retenir la valeur seuil de 1.70 ng/ml.

Peu d'études se sont intéressées au seuil diagnostique de l'A, pour définir une HA avec la technique de dosage LC-MS/MS.

Haring et al ont déterminé des valeurs de référence en fonction de l'âge des patientes. Pour les femmes âgées de 20-29 ans et de 30-39ans, le 97^{ème} percentile était respectivement de 2.1 ng/ml et 1.7 ng/ml. *Barth et al* propose le même seuil (1.70 ng/ml) d'après leur étude portant sur 107 femmes. Bien que nous n'ayons pas classé nos patientes selon leur âge, ces résultats sont en accord avec notre seuil de 1.70 ng/ml.

Kushnir et al proposent un seuil plus élevé, à 2.12 ng/ml pour définir l'HA chez des femmes âgées de 18 à 40 ans.

Par ailleurs, l'étude de *Fanelli et al* sur 159 jeunes patientes propose un seuil d'A en phase folliculaire à 1.54 ng/ml. Nos résultats sont plus proches de cette analyse que l'étude de *Rauh*

et al qui elle propose le seuil de 3.06 ng/ml. Cependant ces deux études concernent exclusivement des adolescentes âgées de moins de 19 ans, hélas bien plus jeunes que dans notre série. La comparaison reste dans ce cas délicate.

L'affirmation dans notre travail d'une performance diagnostique équivalente à la technique RIA, nous permet aujourd'hui de généraliser l'utilisation de la spectrométrie de masse pour le dosage de l'A au sein de nos pratiques cliniques et de recherche.

L'ensemble de ce travail nous amène à nous interroger sur deux points :

- i) La place de l'AMH dans la classification diagnostique du SOPK, comme potentiel marqueur de PCOM voire d'HA.
- ii) L'utilisation préférentielle de l'A plutôt que la T totale pour le diagnostic d'HA dans la classification du SOPK.

Pour certains, l'AMH serait un marqueur plus sensible et plus complet que le CFA puisqu'elle est sécrétée en partie par les petits follicules (primaires, secondaires et préantraux) non visibles à l'échographie pelvienne réalisée en début de phase folliculaire (*Jeppesen et al 2013, Dewailly et al*). Les auteurs Catteau-Jonard S et Dewailly D. proposent d'inclure l'AMH en substitut ou en complément du CFA pour la définition de PCOM, (PCO like) au sein de la classification de Rotterdam.

Par ailleurs, notre travail vient confirmer la corrélation de l'AMH avec les androgènes chez les patientes SOPK, que ce soit l'A ou la T totale en accord avec les études de *Pigny et al 2003* et *Laven et al 2004*.

Sur le plan physiopathologique pour expliquer cette corrélation, l'HA amènerait à une augmentation du nombre de follicules préantraux et petits antraux et par conséquent de la sécrétion d'AMH par les cellules de la granulosa (*Eldar Geva et al 2005*).

Au regard de ces résultats, l'AMH pourrait également être considérée comme un marqueur de l'HA et pourrait venir s'ajouter à la T ou l'A. Le concept d'un « gold standard » du SOPK est encore prématuré.

L'A, contrairement à la T, est le reflet direct de la synthèse ovarienne. La testostérone, quant à elle, est en grande partie issue d'une conversion périphérique de précurseurs androgéniques. Notre étude a démontré, par comparaison de leur ASC, que l'A serait plus performante que la T pour distinguer les témoins des SOPK. Par conséquent, le choix de l'A comme marqueur biologique spécifique, pourrait nous permettre de mieux classer les patientes HA versus non HA.

Le tableau suivant rappelle les différences et similitudes des deux marqueurs que nous avons étudiés :

Hormone anti-Müllérienne	Delta 4 androstènedione
Exprimée dans les cellules de la granulosa	Synthétisée dans les cellules de la thèque
Pas de variation au cours du cycle	Maximale en fin de phase folliculaire
Marqueur de PCOM + hyperandrogénie	Définition précise de l'hyperandrogénie
Valeur sérique liée à l'âge de la patiente	
Intérêt pour la stratégie thérapeutique/ l'évaluation du risque d'hyperstimulation	Intérêt uniquement diagnostique
Valeurs élevées prédictives de formes plus sévères.	

D'autres études devront venir compléter nos résultats pour l'inclusion de ces deux marqueurs dans la classification diagnostique du SOPK.

Dans le cas précis du diabète de type I associé au SOPK, l'utilisation des seuils de ces deux marqueurs pourrait ne plus être adaptée. Selon l'étude publiée par *Codner et al de 2007*, les taux d'AMH et de l'A seraient moins élevés chez ces patientes comparées aux SOPK non diabétiques, alors que les valeurs de testostérone totale restent comparables.

Ces deux études rétrospectives ont présenté des similitudes dans leur protocole. Les patientes ont toutes été incluses selon les mêmes critères d'inclusion, depuis une unique base de données. La même analyse par cluster a été réalisée dans les deux cas. Les patientes étudiées dans l'article sur l'A appartenaient toutes à la cohorte du 1^{er} article. Cependant comme le montre la différence d'effectif (126 versus 89 patientes) une partie des patientes incluses dans l'étude sur l'AMH, récemment inscrites dans la base de données générale, n'avaient pas de valeurs d'A obtenues avec la technique RIA (données manquantes) ne permettant pas la comparaison avec la spectrométrie de masse et ont donc été exclues.

Ce travail a la particularité de n'avoir étudié que les SOPK hyperandrogéniques ; les SOPK « mild » c'est-à-dire présentant une OA + PCOM n'ont pas été incluses.

Le phénotype hyperandrogénique des SOPK pourrait expliquer que le seuil d'AMH choisi ici soit plus élevé que celui proposé par certains autres auteurs. L'étude de Yi Li et al rappelle en effet que l'AMH demeure plus élevée chez ces patientes SOPK que chez les patientes SOPK non hyperandrogéniques.

7. CONCLUSION

L'AMH et la delta 4 androstènedione sont deux biomarqueurs pertinents pour le diagnostic de SOPK et sont le reflet de la double dysrégulation cellulaire. La standardisation de leurs techniques de dosage est un enjeu actuel.

Les deux techniques de dosage de l'AMH : EIA-AMH/MIS et Gen II demeurent équivalentes pour faire le diagnostic et le seuil retenu ici est de 40 pmol/l (5.6 ng/ml). Les taux sériques de l'AMH avec AL-105i sont plus bas, et le meilleur seuil pour différencier les deux groupes est de 32 pmol/l (4.5 ng/ml). La technique de dosage la plus récente et totalement automatisée Elecsys-AMH reste à être étudiée dans le SOPK. Son analyse pourrait faire l'objet d'un travail ultérieur en intégrant également un groupe de patientes SOPK non hyperandrogéniques à notre population initiale.

Le seuil d'A retenu pour différencier, dans cette étude, les témoins des SOPK avec la technique LC-MS/MS est de 1.70 ng/ml. Les performances diagnostiques équivalentes des techniques RIA et LC-MS/MS pour le dosage de l'A dans le SOPK, et le bénéfice des dosages multiplex nous orientent vers l'utilisation préférentielle de la spectrométrie de masse.

8. BIBLIOGRAPHIE

Abbott DH, Dumesic DA, Eisner JR, Colman RJ, Kemnitz JW. Insights into the development of polycystic ovary syndrome (PCOS) from studies of prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9(2):62-67.

Anderson RA, Anckaert E, Bosch E, Dewailly D, Dunlop CE, Fehr D, Nardo L, et al. Prospective Study into the Value of the Automated Elecsys Antimüllerian Hormone Assay for the Assessment of the Ovarian Growing Follicle Pool. *Fertil Steril* 2015.

Azziz R, Carmina E, Dewailly D, et al. Position statement criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(11):4237-4245.

Azziz R, Sanchez LA, Knochenhauer ES, Moran C, Lazenby J, Stephens KC, Taylor K, et Boots LR. Androgen Excess in Women: Experience with Over 1000 Consecutive Patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(2):453-462.

Azziz R, Wood KS, Reyna R, Key TJ Knochenhauer ES et Yildiz BO. The prevalence and faecture of the polycystic ovary syndrome in unselected population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6):2746-2749.

Barth JH, Field HP, Yasmin E, Balen AH. Defining hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome: measurement of testosterone and androstenedione by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and analysis by receiver operator characteristic plots. *Eur J Endocrinol/Eur Fed Endocr Soc* 2010; 162(3):611-615.

Beckman Coulter. Urgent Field Safety Notice FSN 20434-3, July 2013. Available at: <http://www.mhra.gov.uk/home/groups/fsn/documents/fieldsafetynotice/con297532.pdf>.

Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Mullerian Inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 1994; 79(3): 415-425.

Cappy H, Pigny P; Leroy-Billiard M, Dewailly D, Catteau Jonard S. Falsely elevated serum AMH level in a context of heterophilic interference. *Fertil Steril* 2013; 99(6):1729-1732.

Carlsen SM, Vanky E, Fleming R. Antimullerian hormone concentrations in androgen-suppressed women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2009; 24(7):1732-1738.

Casadei L, Madrigale A, Puca F, Manicuti C, Emidi E, Piccione E et Dewailly D. The role of serum anti-Mullerian hormone (AMH) in the hormonal diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2013; 29(6):545-550.

Catteau-Jonard S, Dewailly D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum Reprod Update* 2004; 10(2):107-117.

Catteau-Jonard S, Dewailly D. Pathophysiology of polycystic ovary syndrome: the role of hyperandrogenism. *Front Horm Res* 2013; 40:22-27.

Chen ZJ, Zhao H, He L, Shi Y, Qin Y, Shi Y, Li Z, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. *Nature Genetics* 2011; 43(1): 55-59.

Codner E, Iñíguez G, Villarroel C, Lopez P, Soto N, Sir-Petermann T, Cassorla F, et Rey RA. Hormonal Profile in Women with Polycystic Ovarian Syndrome with or without Type 1 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(12):4742-4746.

Decanter C, Morschhauser F, Pigny, AMH follow-up in young women treated by chemotherapy for lymphoma: preliminary results. *Reprod Biomed Online* 2010; 20(2):280-285.

Dewailly D, Alebi M, Duhamel A, et Stojanovi N. Using Cluster Analysis to Identify a Homogeneous Subpopulation of Women with Polycystic Ovarian Morphology in a Population of Non-Hyperandrogenic Women with Regular Menstrual Cycles. *Human Reprod* 2014; 29(11):2536-2543.

Dewailly D, Gronier H, diagnostic of polycystic ovary syndrome revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod* 2011; 26(11):3123-3129.

Dewailly D, Pigny P, Soudan B, Catteau-Jonard S, Decanter C, Poncelet E, Duhamel A. Reconciling the definitions of PCOS: the ovarian follicle number and serum AMH aggregate with the markers of hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(9):4399-4405.

Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, Griesinger G, Kelsey TW, La Marca A, Lambalk C, Mason H, Nelson SM, Visser JA, Wallace W.H et Anderson R.A. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. *Hum Reprod.* 2014; 20(3):370-385.

Di Clemente N, Jamin SP, Processing of antimullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-Beta. *Mol Endocrinol* 2010; 24(11):2193-2206.

Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 2002; 124(5):601-609.

Eilertsen TB, Vanky E, et Carlsen SM. Anti-Mullerian Hormone in the Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome: Can Morphologic Description Be Replaced? *Hum Reprod* 2012; 27(8):2494-2502.

Eldar-Geva T. Serum Anti-Mullerian Hormone Levels during Controlled Ovarian Hyperstimulation in Women with Polycystic Ovaries with and without Hyperandrogenism. *Hum Reprod* 2005; 20(7):1814-1819.

Fanelli F, Belluomo I, Di Lallo VD, et al. Serum steroid profiling by isotopic dilution-liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with current immunoassays and reference intervals in healthy adults. *Steroids* 2011; 76(3):244-253.

Fauser BC, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, Carmina E, 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; 97(1):28-38.

Franks S, Webber LJ, Goh M, Valentine A, White DM, Conway GS, Wiltshire S, et McCarthy MI. Ovarian Morphology Is a Marker of Heritable Biochemical Traits in Sisters with Polycystic Ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(9):3396-3402.

Gassner D, Jung R. First fully automated immunoassay for AMH. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52(8):1143-1152

Gilling Smith C, Story H, Rogers V, Franks S. Evidence for a primary abnormality of thecal cell steroidogenesis in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*.1997; 47(1):93-99.

Glueck CJ, Phillips H, Cameron D, Sieve Smith L, Wang P. Continuing metformin throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appears to safely reduce first- trimester spontaneous abortion: a pilot study 2001; 75(1):46-52.

Green J, Sinclair R. Skin manifestation of polycystic ovary syndrome. In Kovacs GT(ed.).*Polycystic Ovary syndrome*. Cambridge University Press. 2000:79-97.

Haring R, Hannemann A, John U, Radke D, Nauck M, Wallaschofski, Owen L, Adaway J, Keevil BG and Brabant G. Age- Specific Reference Ranges for Serum Testosterone and Androstenedione concentrations in Women Measured by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(2): 408-415.

Homburg R, Ray A, Bhide P, Gudi A, Shah A, Timms P, et Grayson K. The Relationship of Serum Anti-Mullerian Hormone with Polycystic Ovarian Morphology and Polycystic Ovary Syndrome: A Prospective Cohort Study. *Hum Reprod*. 2013; 28(4): 1077-1083.

Iliodromiti S, Kelsey TW, Anderson RA, Nelson SM. Can AMH predict the diagnosis of PCOS? A systematic review and meta-analysis of extracted data. . *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(8):3332-3340.

Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG, Jayaprakasan K, Raine-Fenning N, Campbell BK, et Yding Andersen C. Which Follicles Make the Most Anti-Mullerian Hormone in Humans? Evidence for an Abrupt Decline in AMH Production at the Time of Follicle Selection. *Mol Hum Reprod* 2013; 19(8): 519-527.

Johnstone EB, Rosen MP, Neril R, Trevithick D, Sternfeld B, Murphy R, Addauan-Andersen C, McConnell D, Pera RR, et Cedars MI. The Polycystic Ovary Post-Rotterdam: A Common, Age-Dependent Finding in Ovulatory Women without Metabolic Significance. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(11): 4965-4972.

Kahsar-Miller MD, Nixon C, Boots LR, Go RC, Azziz R. Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS. *Fertil Steril* 2001;75:53-58.

Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, et al. Serum AMH levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* 2006; 147(7):3228-3234.

Kosova G, Urbanek M. Genetics of the polycystic ovary syndrome *Mol Cell Endocrinol* 2013; 373(1-2): 29-38.

Kuiri-Hänninen T, Kallio S, Seuri R, Tyrväinen R, Liakka A, Tapanainen J, Sankilampi U, et Leo Dunkel. Postnatal Developmental Changes in the Pituitary-Ovarian Axis in Preterm and Term Infant Girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(11): 3432-3439.

- Kushnir MM*, Blaires T, Rockwood AL, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for androstenedione, dehydroepiandrosterone, and testosterone with pediatric and adult reference intervals. *Clin Chem* 2010; 56(7):1138-1147.
- Laven JS*, Mulders AG, Visser JA, Themmem AP, De Jong FH, Fauser BC. Anti-Mullerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive history. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 89(1):318-323.
- Li Y*, Ma Y, Chen X, Wang W, Li Y, Zhang Q, et Yang D. Different Diagnostic Power of Anti-Mullerian Hormone in Evaluating Women with Polycystic Ovaries with and without Hyperandrogenism. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(10): 1147-1151.
- Lujan ME* et al. Updated ultrasound criteria for polycystic ovary syndrome: reliable thresholds for elevated follicle population and ovarian volum. *Hum Reprod* 2013; 28(5):1361-1368.
- Magoffin, D.A.* The ovarian androgen-producing cells: A 2001 perspective. *Rev Endocr Metab Disord* 2002; 3(1):47-53.
- Magoffin DA.* The role of the ovary in the genesis of hyperandrogenism: The ovary 2003; (2nd ed., pp513-522). San diego; Academic Press/Elsevier Science Publishers.
- Magoffin DA.* Ovarian theca cell. *Int J Biochem cell biol* 2005; 37(7):1344-1349.
- March WA*, Moore VM, Willson KJ, Phillips DIW, Norman RJ, et Davies MJ. The Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome in a Community Sample Assessed under Contrasting Diagnostic Criteria. *Hum Reprod* 2010; 25(2):544-551.
- McAllister JM*, Modi B, Miller BA, Biegler J, Bruggeman R, Legro RS, Strauss JF 3rd. Overexpression of a DENND1A isoform produces a polycystic ovary syndrome theca phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(15):E1519-E1527.
- Mehrabian F*, Khani B, Kelishadi R, Ghanbari E. The prevalence of polycystic ovary syndrome in Iranian women based on different diagnostic criteria. *Endokrynol Pol.* 2011; 62(3):238-242.
- Pellat L*, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, Brown K, Simpson ER, Mason HD. Anti-Mullerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril* 2011; 96(5):1246-1251.
- Pigny P*, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. Elevated Serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian Follicle excess and to follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(12):5957-5962.
- Pigny P*, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Serum AMH as a surrogate for antral follicle count for definition of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(3):941-945.
- Pigny P.* Le dosage plasmatique de l'hormone anti-mullerienne: où en est-on en 2013? *Med reprod, Gynécol Endocrinol* 2014; 16(1):16-20.
- Rashidi H*, Tehrani FR, Khomami MB, Tohidi M, et Azizi F. To What Extent Does the Use of the Rotterdam Criteria Affect the Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome? A Community-Based Study from the Southwest of Iran. *Europ J Obst Gynecol Reprod Biol* 2014; 174:100-105.

- Rauh M, Groschl M, Rascher W, Dorr HG.* Automated, fast and sensitive quantification of 17 alpha hydroxy-progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Steroids* 2006; 71(6):450-458.
- Rosenfield RL, Wroblewski K, Padmanabhan V, Littlejohn E, Mortensen M, et. Ehrmann DA.* Antimüllerian Hormone Levels Are Independently Related to Ovarian Hyperandrogenism and Polycystic Ovaries. *Fertil Steril* 2012; 98(1): 242-249.
- Tehrani FR, Simbar M, Tohidi M, Hosseinpanah F et Azizi F.* The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample of Iranian population: Iranian PCOS prevalence study. *Reprod Biol Endocrinol.*2011; 9(39):39.
- The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus work-shop group.* Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004; 19(1):41-47.
- Van Houten EL, Themmen AP, Visser JA.* Anti-Müllerian hormone (AMH): regulator and marker of ovarian function. *Ann Endocrinol.* 2010; 71(3):191-197.
- Vogeser M, Parhofer KG.* Liquid chromatography tandem mass spectrometry technique and application. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007; 115(9):559-570.
- Wallace AM, Faye SA, Fleming R, Nelson SM.* A multicenter evaluation of the new Beckman coulter anti-Müllerian hormone immunoassay (AMH Gen II). *An Clin Biochem* 2011; 48(Pt4):370-373.
- Weenen C, Laven JSE, Von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P et al.* Anti-Müllerian Hormone Expression Pattern in the Human Ovary: Potential Implications for Initial and Cyclic Follicle Recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004; 10(2):77-83.
- Yildiz, BO, Bozdag G, Yapici Z, Esinler I, et Yarali H.* Prevalence, Phenotype and Cardiometabolic Risk of Polycystic Ovary Syndrome under Different Diagnostic Criteria. *Hum Reprod* 2012; 27(10):3067-3073.
- Zawadzki JK et al.* Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome In: Givens JHF, Merriman G, editors. *The Polycystic ovary Syndrome.* Cambridge, MA: Blackwell Scientific; 1992:377-3

Titre de Thèse : Evaluation comparative et critique des nouvelles techniques de dosage de l'hormone anti-Müllerienne et de la delta 4 androstènedione pour le diagnostic du syndrome des ovaires polykystiques.

RESUME

OBJECTIFS : Evaluer les performances diagnostiques et définir les valeurs seuils des techniques de dosage de l'hormone anti-Müllerienne (AMH) (EIAAMH/MIS ; Gen II ; AL-105i) et de la delta 4 androstènedione (A) (RIA ; LC-MS/MS) pour le diagnostic du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK).

MATERIELS ET METHODES : Deux études rétrospectives ont inclus 126 (dont 66 contrôles et 60 SOPK) et 89 patientes (dont 40 contrôles et 49 SOPK) à partir de données recueillies prospectivement entre 2012 et 2014 dans le service de gynécologie endocrinienne du CHRU de Lille. Une analyse par cluster a permis d'exclure les patientes OPK asymptomatiques des groupes contrôles.

RESULTATS : Pour le dosage de l'AMH, les trois techniques sont fortement corrélées, mais EIA-AMH/MIS demeure plus sensible (97%) que Gen II (92%) et AL-105i (75%) pour différencier les patientes SOPK des témoins. Les valeurs seuils obtenues sont respectivement de 41, 44 et 32 pmol/l. Pour l'A, les seuils de 1.70 ng/ml et 1.94 ng/ml offrent le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité pour les techniques LC-MS/MS et RIA respectivement, avec des performances diagnostiques équivalentes.

CONCLUSION: L'AMH et l'A sont d'excellents biomarqueurs pour le diagnostic de SOPK, reflète de la dysrégulation des cellules thécales et de la granulosa. L'analyse de la récente technique de dosage de l'AMH totalement automatisée pourrait faire l'objet d'un travail ultérieur dans cette population, en ajoutant cette fois des patientes SOPK au phénotype non hyperandrogénique.

MOTS CLÉS

SYNDROME DES OVAIRES POLYKYSTIQUES
HORMONE ANTI-MULLERIENNE
ANDROSTENEDIONE
DOSAGE