UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

Année 2014 **N° 192**

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Présenté et soutenu publiquement le 14 Octobre 2014

Par Anaïs GALLAIS UMBERT
Née le 20 décembre 1985

Conformément aux dispositions du décret n° 2003-76 du 23 Janvier 2003
tient lieu de

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

SUIVI DE L'HORMONE ANTI-MÜLLERIENNE (AMH), MARQUEUR DE RÉSERVE OVARIENNE CHEZ DES FEMMES DE MOINS DE 40 ANS TRAITÉES PAR CHIMIOTHÉRAPIE POUR CANCER DU SEIN

ÉTUDE RESOVA

Président : Monsieur le Professeur Paul BARRIERE
Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Damien MASSON
Membres du jury : Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD
Monsieur le Docteur Thomas FREOUR
Monsieur le Professeur Michaël GRYNBERG

REMERCIEMENTS

A Mr. Le Professeur Paul Barrière,
Vous me faites l'honneur de présider cette thèse.
Veuillez recevoir l'expression de ma reconnaissance.

A Mr. Le Professeur Jean-Marie Bard,
Pour l'honneur que vous me faites de siéger dans ce jury,
Veuillez recevoir l'expression de mon plus profond respect.

A Damien Masson,
Tu as accepté d'être mon directeur de thèse. Tu m'as fait confiance pour participer à cette étude et ce fut un honneur pour moi. Je te remercie sincèrement pour ton soutien, tes conseils avisés, ta disponibilité et ton enthousiasme inépuisable. J'admire ton savoir et la bienveillance dont tu fais preuve envers toutes les personnes qui t'entourent.

A Thomas Fréour,
Je te remercie pour avoir co-dirigé cette thèse, et pris le temps de relire ce manuscrit. Tes connaissances en biologie de la reproduction, tes remarques et suggestions ont enrichi ce travail et j'espère vivement continuer cette collaboration : RESOVA n'est pas finie !

A Mr. le Professeur Michaël Grynberg,
Connaissant votre engagement pour la préservation de la fertilité féminine en oncologie, c'est un honneur pour moi qui vous acceptiez de juger ce travail. Vous vous déplacez de loin pour siéger dans ce jury et je vous en remercie : j'espère que les travaux présentés seront à la hauteur de vos exigences.

Je tiens à remercier également :

-Corinne, Thi-Anh-Nga, Evelyne et Martine : ensemble nous sommes venus à bout des 2500 dosages d'AMH !

-le service de Biochimie de Nantes

- Pr Marc Denis qui m'honore de sa confiance pour intégrer l'équipe du laboratoire,

- Kalyane Bach, son aide pour les statistiques m'a été précieuse,

- Didier Le Career et Edith Bigot pour leur acceuil au laboratoire de l'HGRL ces 3 derniers mois,

-Thomas Dejoie, Hélène Caillon, Nolwenn Graveline, Anne-Gaëlle Le Loupp et les autres, nombreux, que je ne cite pas ici.

-Elsa, Julie, Mathilde et Sophie : des co-internes hors pair,

-Wladimir Chellé, pour m'avoir donné du temps pour cette thèse,

-Julie D. en souvenir de notre arrivée commune à Challans.

Je dédie ce travail :

à Raoul,

à mes parents,

à Aurore et Ruben, Marine, Mathilde, Xenia et Ludovic.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **2**

LISTE DES FIGURES **8**

LISTES DES TABLEAUX **10**

LISTE DES ABREVIATIONS **11**

INTRODUCTION **13**

GENERALITES **14**

I. LA RESERVE OVARIENNE **14**

1. Etablissement de la réserve de follicules primordiaux 16
2. Evolution de la réserve ovarienne chez les femmes pubères : physiologie de la déplétion du stock d'ovocytes 18
3. Les populations folliculaires primordiale et antrale: physiologie et histologie 19
4. Régulation des populations folliculaires primordiale et antrale 21
   a. Activation et quiescence des follicules primordiaux : état des connaissances des voies moléculaires régulatrices 21
   b. La folliculogénèse antrale: frein paracrine au recrutement basal 23
      Les facteurs d'origine ovocytaire 23
      Les facteurs d'origine thécale et stromale 23
      L'hormone anti-müllerienne (AMH) synthétisée par les cellules de la granulosa 23
      Rôle de la FSH dans le soutien de la folliculogénèse antrale 24

II. AMH : ACTEUR ET MARQUEUR DE LA RESERVE OVARIENNE **25**

1. AMH : membre de la famille des TGF beta 25
   a. Le gène de l'AMH 25
   b. La protéine 25
2. Origine de l'AMH : les cellules de la granulosa 25
3. Profil de l'expression ovarienne de l'AMH 26
4. Rôle physiologique de l'AMH 27
   a. Récepteurs de l'AMH : signalisation et mécanismes d'action 27
   b. Effets biologiques de l'AMH sur la folliculogénèse 28
5. AMH : Marqueur de réserve ovarienne 30
   a. âge 30
   b. Facteurs de variation de l'AMH (en dehors de l'âge) 31
      Variabilité inter-individuelle et cycle menstruel 31
      Ethnie 32
      Contraception oestro-progestative 32
      Grossesse et pré-éclampsie 32
      Tabac 32
      Indice de Masse Corporelle 32

III. LE CANCER DU SEIN : épidémiologie et oncogénèse **33**

1. Epidémiologie 33
2. Présentation clinique et circonstances du diagnostic 34
3. Anatomie et Physiologie mammaire 34
   a. Anatomie 34
   b. Physiologie 35
   c. Prolifération et différenciation de l'épithelium mammaire 36

4. Oncogénèse mammaire et oestrogènes 37
a. Modèles 37
b. L'implication des oestrogènes dans la carcinogénèse mammaire 38

IV. PRISE EN CHARGE DU CANCER DU SEIN 40
1. La classification des tumeurs mammaires 40
a. Classification TNM 40
b. Classification histologique 41
c. Classification moléculaire 42
d. Particularités des cancers de la femme jeune 43
2. Stratégies thérapeutiques : synthèse des recommandations et conférences de consensus 43
a. Chirurgie 43
Circonstance curative 43
Circonstance préventive 44
b. Radiothérapie 44
c. Chimiothérapie 45
d. Hormonothérapie 46
e. Autres thérapies 47
f. Suivi 47

V. TOXICITE OVARIENNE DES CHIMIOTHERAPIES UTILISEES DANS LE CANCER DU SEIN 49
1. Cytotoxicité et ovaire 49
2. Les effets ovariens selon les molécules utilisées 50
a. L'atteinte folliculaire directe 50
Cyclophosphamide 50
Anthracyclines 51
Le 5 FU : anti métabolite 52
Taxanes : poisons du fuseau mitotique 53
b. Atteinte du stroma et de la vascularisation ovarienne 53

OBJECTIFS 55

MATERIELS ET METHODES 56
I. Design de l'étude 56
II. Déroulement de l'étude 56
III. Sélection de la population étudiée 57
IV. Données évaluées 58
V. Suivi biologique de l'AMH sérique, marqueur de réserve ovarienne 59
VI. Analyses statistiques 60

RESULTATS 61

I. Caractéristiques générales de la population étudiée 61
a. Démographie 61
b. Diagnostic histologique, moléculaire et extension 61
c. Antécédents familiaux et statut des gènes BRCA 61
d. Prise en charge thérapeutique 63

II. Analyse de la concentration d'AMH mesurée au diagnostic 64
a. Concentration d'AMH et âge de la cohorte RESOVA au diagnostic 64
b. Sélection de la population étudiée 65
Exclusion des patientes non dosables 65
Exclusion des patientes à forte suspicion biologique de SOPK 65
c. Concentration d'AMH et âge de la population étudiée au diagnostic 66

III. Analyse des variations des concentrations d'AMH pendant la chimiothérapie ... 67
a. Analyse de la concentration d'AMH après la 1ère cure de chimiothérapie (FEC 100) 68
b. Analyse de la concentration d'AMH après la 2ème cure de chimiothérapie (FEC 100) 69
c. Analyse de la concentration d'AMH après la 3ème cure de chimiothérapie (FEC100) 70
d. Analyse de la concentration d'AMH après la 4ème cure de chimiothérapie (Taxotère®) 71
e. Analyse de la concentration d'AMH après la 5ème cure de chimiothérapie (Taxotère®) 72

IV. Comparaison des variations de concentration d'AMH au cours de la chimiothérapie 73
a. Effet de l'âge 73
b. Effet de la valeur absolue de la concentration d'AMH préthérapeutique 74

V. Description du moment d'indétectabilité 75

VI. Description du statut menstruel à la dernière cure de chimiothérapie 76

DISCUSSION 76

I. Analyse de la population étudiée 77
a. Démographie 77
b. Antécédents et hérédité 78
c. Diagnostic histologique et moléculaire 78
d. Prise en charge 79

II. Méthode de dosage et normogramme de la concentration d'AMH 79
a. Aspects analytiques 79
b. Normogramme 81
c. Appréciation des concentrations d'AMH au diagnostic chez les patientes sélectionnées 81
d. Exclusion de l'analyse de décroissance des patientes à concentration d'AMH pathologique au diagnostic 82

III. Suivi de la concentration d'AMH 82
a. Effectif de la population 82
b. Protocoles de chimiothérapie 83
c. Critères d'inclusion 83
d. Concentration d'AMH au diagnostic 85
e. Indétectabilité de la concentration d'AMH au cours de la chimiothérapie 85
f. Cinétique de décroissance de l'AMH per-chimiothérapie 86

IV. Processus physiopathologique de l'atteinte de la réserve ovarienne sous chimiothérapie : hypothèses 88
a. Atteinte directe des follicules en croissance 88
b. Atteinte directe de follicules primordiaux 88
c. Déplétion indirecte des follicules primordiaux 88

V. AMH, réserve ovarienne et aménorrhée 89
a. Valeur informative de l'AMH sur l'atteinte de la réserve ovarienne pendant la chimiothérapie 89
b. Statut menstruel pendant la chimiothérapie, aménorrhée chimio-induite et fonction ovarienne 89
c. Synthèse de la littérature sur les relations entre AMH et aménorrhée post chimiothérapie après cancer du sein 91
d. Aménorrhée, récidive et survie post chimiothérapie du cancer du sein 92

CONCLUSION et PERSPECTIVES 94

BIBLIOGRAPHIE 96

LISTE DES FIGURES

Généralités

Figure 1 : Schéma général de la folliculogénèse ……..14

Figure 2 : Représentation du nombre de follicules primordiaux présents dans l'ovaire et de la qualité ovocytaire aux différentes périodes de vie reproductive en fonction de l'âge de la femme 15

Figure 3 : Ovogénèse humaine 17

Figure 4 : Coupe schématisée de l'ovaire 19

Figure 5 : La folliculogénèse antrale : aspect histologique, classification, diamètre, durée de maturation, taux d'atrésie, participation à la concentration sérique d'AMH et proportion évaluée par le CFA..... 20

Figure 6 : Régulation de l'activation des follicules primordiaux 24

Figure 7 : Coupe d'ovaire de souris : expression de l'AMH marquée en immuno-histo-chimie 26

Figure 8 : Rôle de l'AMH dans la régulation de l'équilibre entre population folliculaire antrale et primordiale..... 29

Figure 9 : Evolution de la concentration d'AMH, de la réserve en follicules primordiaux et du recrutement basal de la naissance à 51 ans 31

Figure 10 : Evolution du nombre de cas incidents et de décès par localisation en France en 2012 chez la femme
Incidence et mortalité du cancer du sein en fonction de l'âge en 2012 33

Figure 11 : Anatomie et physiologie mammaire 35

Figure 12 : Implication des cellules souches mammaires dans la prolifération et la différenciation de l'épithélium mammaire au sein du bourgeon terminal et des canalicules formés 36

Figure 13 : Classification TNM et stade selon l'AJCC 40

Figure 14 : Coupes histologiques des principaux types tumoraux et grade de SBR 41

Figure 15 : Types moléculaires du cancer du sein, réponse attendue aux traitements et pronostic..... 42

Résultats

Figure 16 : Concentration d'AMH au diagnostic des patientes traitées par 3 FEC + 3 à 4 Taxotère® (n=165) 64

Figure 17 : Concentration d'AMH au diagnostic en fonction de l'âge (n=165) 64

Figure 18 : Concentration d'AMH initiale des patientes suspectes de SOPK en fonction de l'âge (n=25) 65

Figure 19 : A. Concentration d'AMH au diagnostic en fonction de l'âge
B. Concentration d'AMH au diagnostic par classe d'âge (n=134) 66

Figure 20 : A. Concentration absolue d'AMH au décours de la chimiothérapie
B. Variation cumulée de la concentration d'AMH après chaque cure de chimiothérapie exprimée en % d'AMH mesurable initiale
C. Variation intercure de la concentration d'AMH exprimée en % d'AMH mesurable initiale 67

Figure 21 : A. Comparaison des concentrations d'AMH initiale des différents groupes de décroissance après 1ère cure de FEC
B. Comparaison de l'âge au diagnostic des différents groupes de décroissance après 1ère cure de FEC 69

Figure 22 : Représentation de la variation de la concentration d'AMH à la 1ère cure (P2P1%) en fonction de la variation imputable à la 2ème cure (P3P2%) 70

Figure 23 : A. Variation de la concentration d'AMH mesurable exprimée en % d'AMH mesurable initiale à l'issue de la 1ère cure en fonction des classes d'âge
B. Variation de la concentration d'AMH mesurable exprimée en % d'AMH mesurable initiale à l'issue de la 2ème cure en fonction des classes d'âge 74

Figure 24 : A. Variation de la concentration d'AMH mesurable exprimée en % d'AMH mesurable initiale à l'issue de la 1ère cure en fonction des classes d'AMH initiale
B. Variation de la concentration d'AMH mesurable exprimée en % d'AMH mesurable initiale à l'issue de la 2ème cure en fonction des classes d'AMH initiale 75

Discussion

Figure 25 : Percentiles et valeurs observées de concentrations d'AMH sérique (ng/mL) en technique BC Immunotech™ (selon La Marca) 81

LISTES DES TABLEAUX

Matériels et méthodes

Tableau 1 : Spécificités techniques du dosage de l'AMH (technique BC Immunotech™) 59

Résultats

Tableau 2 : A. Caractéristiques démographiques des patientes de la cohorte RESOVA
B. Caractéristiques démographiques, histologiques et génétiques
des patientes sélectionnées..... 62

Tableau 3 : Caractéristiques moléculaires des tumeurs de patientes traitées
par 3 FEC + 3 à 4 Taxotère® en fonction du grade, de l'extension ganglionnaire et
métastatique 62

Tableau 4 : Caractéristiques de la prise en charge thérapeutique en fonction du grade,
de l'extension ganglionnaire et métastatique et du statut des récepteurs
hormonaux et HER2 63

Tableau 5 : Distribution de l'âge et de la concentration d'AMH au diagnostic
par classe d'âge (n=165) 64

Tableau 6 : Caractéristiques du moment d'indétectabilité per-chimiothérapie
selon les classes d'âge et de concentration d'AMH au diagnostic..... 75

Tableau 7 : Caractéristiques des patientes présentant ou non des règles
pendant la 6ème cure de chimiothérapie 76

Discussion

Tableau 8 : Distribution des concentrations d'AMH en ng/mL (IC 90%)
en fonction de l'âge (technique BC Immunotech™) selon La Marca 81

Tableau 9 : Caractéristiques et résultats des principales études sur l'AMH,
marqueur de réserve ovarienne après chimiothérapie du cancer du sein 84

Tableau 10 : Estimation du risque d'aménorrhée permanente après chimiothérapie
selon les molécules et les régimes administrés 93

LISTE DES ABREVIATIONS

AC=adriamycine cyclophosphamide
ADN= acide désoxyribo-nucléique
AJCC= American Joint Committee on Cancer
AKT= protéine kinase B
ALK=anaplastic lymphoma kinase
AMH=anti mullerian hormone=hormone anti-müllerienne
AMHR=anti mullerian hormone receptor=récepteur de l'AMH
ARN=acide ribo-nucléique
AUC=area under curve= aire sous la courbe
BC=Beckman Coulter™
BCSC=breast cancer stem cell
bFGF=b fibroblast growth factor
BMP=bone morphogenic protein
BMP4=bone morphogenic protein 4
BMP7=bone morphogenic protein 7
BMP15=bone morphogenic protein 15
BRCA=gène BReast Cancer
CCIS=carcinome canalaire in situ
CFA=compte folliculaire antral
c-Kit= récepteur Kit
CHU=centre hospitalo-universitaire
CMF=cyclophosphamide méthotrexate 5-fluoro-uracile
CO=contraception orale
COMT=catéchol-o-méthyl-transferase
CRA=chemotherapy related amenorrhea = aménorrhée chimio induite
CRLCC=centre régional de lutte contre le cancer
CV=coefficient de variation
DSL=diagnostic system laboratories™
EGFR=epidermal growth factor receptor
ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay
EORTC=european organisation for research and treatment of cancer
ER=estrogen receptor
ESMO=european society of medical oncology
ET=écart-type
FEC=5-fluoro-uracile épirubicine cyclophosphamide
FSH=follicle stimulating hormone=homone folliculo-stimulante
Foxl2=forkhead box 2
FT=facteur de transcription
5FU=5 fluoro uracile
FUTP=fluorouridine triphosphate
GDF9=growth differencaition factor
GST=glutathion S transferase
HER2=human epidermal growth factor
IARC=international agency for research on cancer
IC=intervalle de confiance
IGF=insuline like growth factor
KGF=keratinocyte growth factor

KL=Kit ligand
KO=knock-out
LH=luteinizing hormone=hormone luteinisante
NOBOX=newborn ovary homeabox protein
NS=non significatif
2 OH-E2= 2 hydroxy estradiol
4 OH-E2=4 hydroxy estradiol
OMS=organisation mondiale de la santé
OR=odds ratio
PHRC=programme hospitalier de recherche clinique
PI3K=phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PR=progesteron receptor
PTEN = phosphatase and tensin homologue
RCP= réunion de concertation pluridisciplinaire
RE = récepteur aux oestrogènes
RH= récepteurs hormonaux
RLO=radicaux libres oxygénés
ROC= receiver operating characteristic
RTK= récepteur à tyrosine kinase
RT-PCR=reverse transcription polymerase chain reaction
SA=semaines d'aménorrhée
SAF=smad associated factor
SBE= smad binding element
SBR= grade de Scarff Bloom Richardson
SCF=stem cell factor
SCID=severe combined immunodeficiency
SERD=selective estrogen downregulator
SERM=selective estrogen receptor modulator
SMAD= Sma et Mad related proteins
SNP=single nuceotide polymorphism
SOHLH1/2= spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1/2
SOPK=syndrome des ovaires polykystiques
TAC=taxotère® adriamycine cyclophosphamide
TAX=taxotère®
TGFβ=transforming growth factor beta
TNM=tumor node metastasis
UI=unité internationale
UICC=union for international cancer control

INTRODUCTION

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent des femmes en âge de procréer. Contrairement aux femmes plus âgées, les tumeurs de ces patientes présentent plus souvent des caractéristiques moléculaires et des grades histopronostiques à fort risque de récidive justifiant une chimiothérapie. La cytotoxicité de ces agents s'exerce sur le tissu tumoral mais aussi sur l'ovaire, avec le risque d'une déplétion folliculaire impactant la fertilité. En France, avec l'évolution des modes de vie, l'âge de la première grossesse augmentant, l'annonce d'un cancer du sein à moins de 40 ans entrave de fait la réalisation des projets de maternité antérieurement prévus. Les rémissions sont heureusement fréquentes et ces femmes espèrent pouvoir devenir mère. Afin de répondre à leurs préoccupations quant au risque d'hypofertilité chimio-induite, les informations données à ces patientes doivent se fonder sur des études décrivant au mieux l'évolution de la réserve folliculaire ovarienne sous chimiothérapie. Parmi les marqueurs biologiques disponibles, l'hormone anti-müllerienne (AMH) est considérée comme le plus représentatif de l'état de la réserve au moment du dosage. L'étude réalisée, multicentrique est une analyse des données pré- et per- chimiothérapie du PHRC RESOVA conçu pour un suivi post chimiothérapeutique de 18 mois. Les objectifs comprennent la description de l'état de la réserve ovarienne au diagnostic et à l'issue immédiate de la chimiothérapie, de la cinétique de décroissance de l'AMH ainsi que l'identification éventuelle de facteurs influençant cette cinétique. La première partie de ce travail consiste en une synthèse des connaissances sur la réserve ovarienne, l'AMH et le cancer du sein afin d'intégrer les enjeux de l'interdépendance hormonale de l'ovaire et du sein, préalable à l'exposé des effets ovotoxiques des chimiothérapies décrits dans la littérature.

GENERALITES

I. LA RESERVE OVARIENNE

Chez la femme, la fertilité est conditionnée par un stock d'ovocytes non renouvelable établi dès la naissance. La vie reproductive prend fin à l'épuisement de la réserve en cellules germinales. Jusqu'à ce moment, des follicules primordiaux sont quotidiennement activés constituant une deuxième population. Cette population de follicules pré-antraux croît indépendamment des gonadotrophines hypophysaires et constitue une réserve dynamique de follicules, au sein de laquelle des follicules matures (stade antral 3 à 5 mm) peuvent être recrutés cycliquement par la FSH pour la sélection, la dominance et l'ovulation (figure 1).

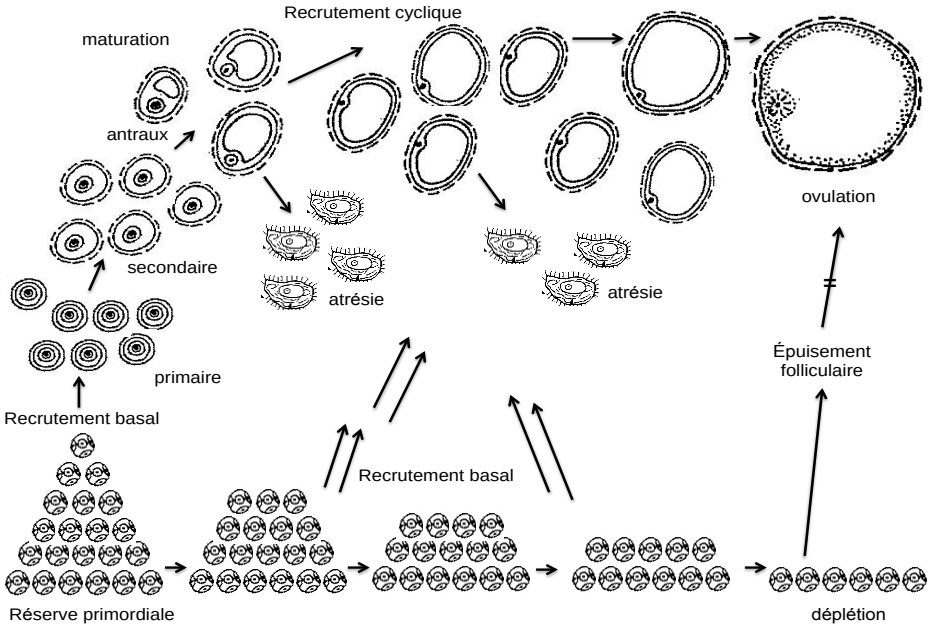


Figure 1 : Schéma général de la folliculogénèse d'après (1)

Le vieillissement ovarien consiste en une diminution parallèle de ces deux réserves mais aussi à une détérioration de la qualité ovocytaire (figure 2). A un âge donné, il existe de plus une variation inter-individuelle importante de la réserve ovarienne. L'espérance de vie reproductive d'une femme dépend donc de la taille initiale de la réserve de follicules ovariens à la naissance et de la cinétique d'épuisement du stock qui s'ensuit en grande partie déterminée par l'hérédité (2).

Dans l'évaluation clinique ou la prévention des troubles de la fertilité (primitifs ou iatrogènes), l'appréciation de la réserve ovarienne est une étape clé dans la démarche diagnostique mais aussi un facteur prédictif des chances de succès de stimulation ovarienne en assistance médicale à la procréation.

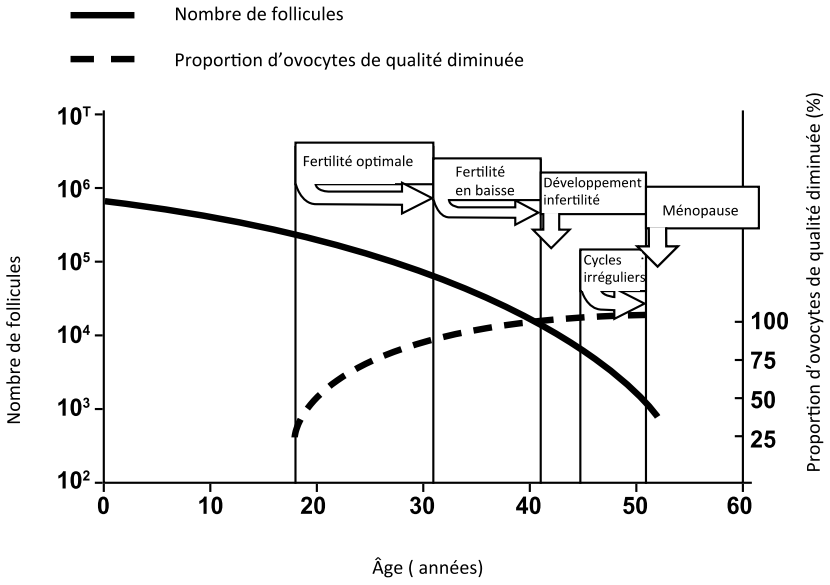


Figure 2 : Représentation du nombre de follicules primordiaux présents dans l'ovaire et de la qualité ovocytaire aux différentes périodes de vie reproductive en fonction de l'âge de la femme (d'après (2)).

1. Etablissement de la réserve de follicules primordiaux

Dès la 2ème semaine de vie embryonnaire, les cellules germinales primordiales sont individualisables dans l'ectoderme primaire. Entre les 3ème et 6ème semaines de vie embryonnaire, ces cellules migrent à plusieurs reprises pour au final coloniser la crête génitale, renflement épithélial du mésenchyme. L'ébauche de la future gonade encore indifférenciée se dessine avec ses cordons sexuels correspondant aux cellules germinales entourées de cellules épithéliales. Pendant ces phases de migration et de colonisation, les cellules germinales primordiales connaissent une prolifération croissante jusqu'à la 8ème semaine. A ce moment, la gonade se différentie en ovaire, les cordons sexuels médullaires involuent, les cellules germinales des cordons corticaux se transforment en ovogonies tout en proliférant. A la 11ème semaine, on dénombre 250000 ovogonies. A partir de la 12ème semaine, une première vague entre en méiose donnant des ovocytes bloqués au stade diplotène de prophase I. Puis vers la 15ème ou 16ème semaine de vie embryonnaire, après fragmentation des cordons sexuels, se forment les premiers follicules primordiaux : les ovocytes s'entourent de cellules somatiques (les futures cellules de la granulosa). La prolifération des ovogonies perdure jusqu'au 5ème mois de vie intra-utérine où le nombre de cellules germinales (ovogonies et 1er ovocytes) atteint son maximum de 5 à 7 millions. Plusieurs vagues de formation folliculaire se succèdent jusqu'à la 34 semaine où la réserve est définitivement constituée, ne variant pratiquement pas jusqu'à la naissance où l'on dénombre de 0,7 à 2 millions de follicules (figure 3).

La grande majorité de follicules primordiaux reste quiescents. Les premières activations sont constatées à la 22ème semaine. A un instant donné, l'ovaire fœtale est ainsi caractérisée par la présence simultanée d'ovogonies, d'ovocytes et de follicules (3).

La constitution de la réserve de follicules primordiaux est marquée par une perte importante : en moyenne seul 1 ovocyte sur 10 pourra s'intégrer dans un follicule (4).

Plusieurs phénomènes sont responsables de ce faible rendement de l'ovogénèse :
-la dégénérescence des ovocytes en cas de non inclusion dans un follicule,
-l'atrésie folliculaire constatée dès le 5ème mois s'accentuant par la suite,
-la nécrose d'ovogonies expulsées à la surface de l'épithélium ovarien.
L'apoptose est le principal mécanisme d'élimination des ovocytes. Un des facteurs déclenchant identifié est l'impossibilité de réparer des aberrations chromosomiques ou génétiques survenues lors de la mitose ou méiose Des processus d'autophagie, d'extrusion directe de l'ovaire et d'arrêt méiotique ont également été décrits (5).

La réserve folliculaire à la naissance est donc le résultat de l'équilibre à toutes les étapes de l'ovogénèse des signaux de prolifération, de survie, et de mort cellulaire reposant entre autres sur la régulation des voies pro- et anti-apoptotiques.

Dès la naissance, le stock initial est ainsi fixé. Néanmoins la présence de cellules souches germinales à la périphérie du cortex a remis en question le dogme de réserve ovarienne non renouvelable (6) lançant la controverse de la néoovogénèse. Si ces cellules existent, leur participation à l'entretien de la réserve de follicules primordiaux après la naissance semble peu probable (7).

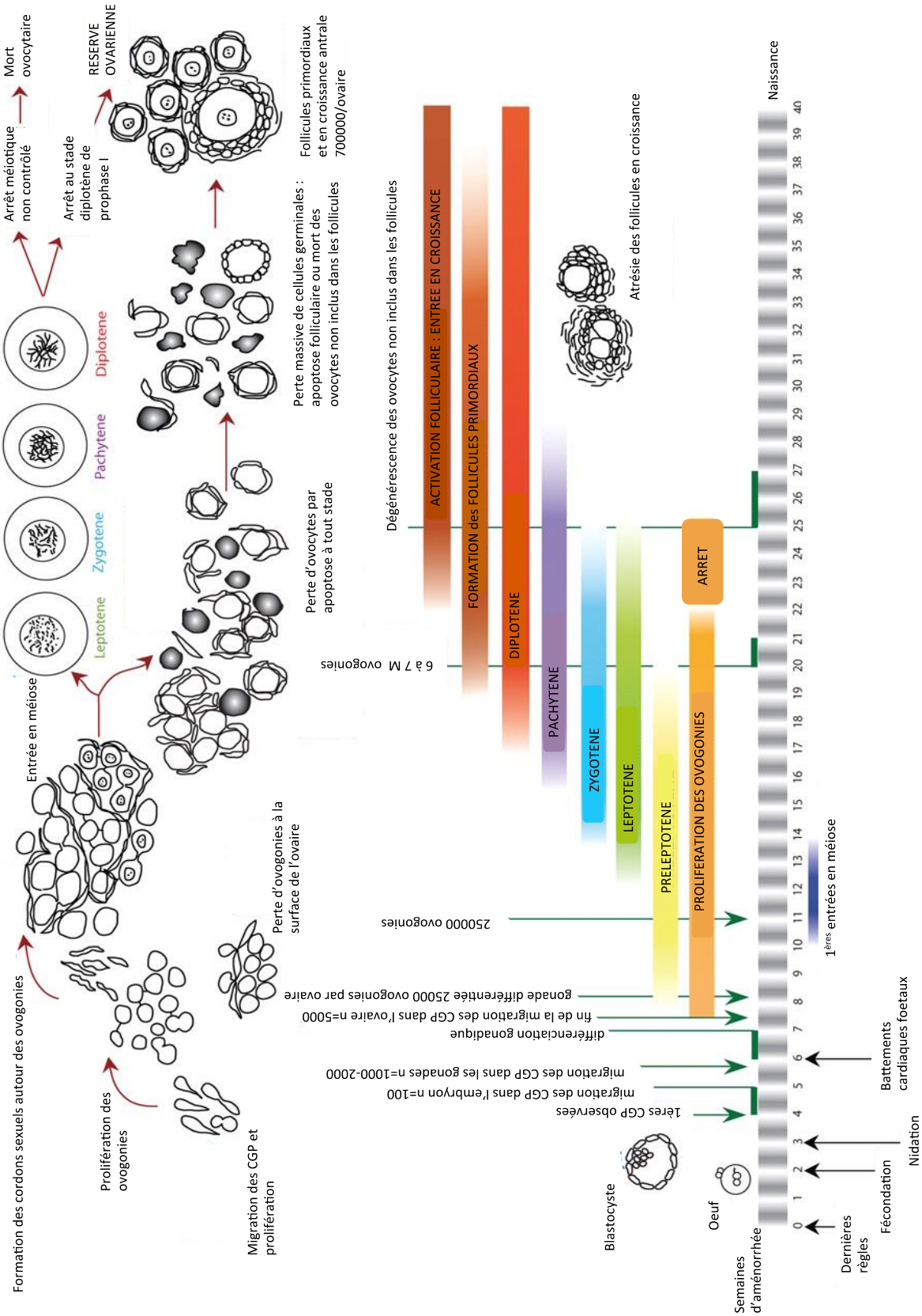


Figure 3 : Ovogénèse humaine d'après (3)

2. Evolution de la réserve ovarienne chez les femmes pubères : physiologie de la déplétion du stock d'ovocytes

De la puberté à la ménopause, sur l'ensemble des 700000 à 2 millions d'ovocytes disponibles à la naissance, 300 à 400 connaîtront la maturation finale conduisant à l'ovulation. Le rendement de la folliculogénèse est encore plus faible que celui de l'ovogénèse : seul 0,5 à 1 follicule sur 1000 sera sélectionné pour la dominance.

Dans l'ovaire post pubère coexistent 3 contingents folliculaires :
-les follicules primordiaux,
-les follicules en croissance antrale,
-les follicules recrutés par la FSH (homone folliculo-stimulante) hypophysaire à chaque cycle menstruel.

Les follicules primordiaux ont trois destinées possibles (8) :
- la survie à l'état quiescent,
- le développement antral suivi soit de l'atrésie soit du recrutement cyclique par la FSH,
- ou la mort (atrésie sans phase d'activation préalable).

Le nombre de follicules primordiaux présents à un instant donné dans le cortex ovarien ne dépend pas directement des étapes de la folliculogénèse contrôlées par les gonadotrophines hypophysaires.

La cinétique d'épuisement des follicules primordiaux dépend donc :
-du taux de recrutement basal ou activation folliculaire marquant le début de la croissance antrale,
-de la survie des follicules primordiaux dans le temps,
-du taux d'atrésie des follicules activés (celle des petits follicules étant quantitativement plus importante que l'atrésie cyclique des follicules recrutés par la FSH).

L'équilibre entre les 3 populations folliculaires garantit une diminution progressive de la réserve et repose sur des mécanismes de régulation paracrine et autocrine intra-ovariens (9).

3. Les populations folliculaires primordiale et antrale: physiologie et histologie

Dans l'ovaire pubère, il existe schématiquement une topographie de la répartition des follicules selon leur état de maturation qui suit un gradient cortico médullaire. Les follicules primordiaux quiescents sont majoritairement retrouvés dans la corticale sous l'épithelium de surface. Les follicules activés et en croissance antrale migrent vers la médullaire (figure 4). Les différents stades folliculaires font l'objet d'une classification largement admise dite de Pedersen (10) reprise dernièrement par Edson et al (11) (figure 5).

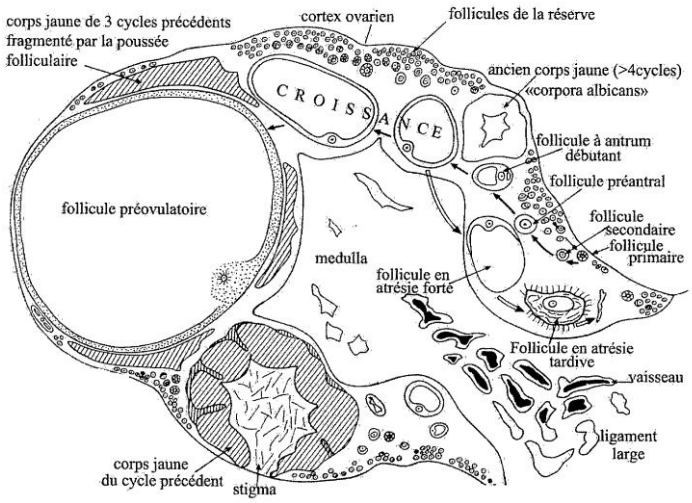


Figure 4 : Coupe schématisée de l'ovaire d'après (12)

D'un point de vue histologique, les follicules primordiaux se constituent de l'ovocyte entouré d'une couche de cellules de la granulosa aplaties. Ils sont en état dit de « quiescence » à activité métabolique minimale.

L'activation des follicules se manifeste par la transformation cuboïdale des cellules de la granulosa qui commencent alors à proliférer. La croissance de l'ovocyte (en arrêt méïotique) survient dans un second temps. Sa taille et son contenu en ARN ainsi que la synthèse protéique augmentent fortement. Le follicule atteint alors une taille de 65 µm et est appelé follicule primaire. Les récepteurs de la FSH apparaissent à ce stade sur les cellules de la granulosa.

Progressivement, le follicule augmente de diamètre par augmentation de la taille ovocytaire puis surtout par prolifération des cellules de la granulosa. Le follicule est classé secondaire quand 2 à 4 couches de cellules de la granulosa sont constituées.

Des facteurs ovocytaires de la famille du TGF-β (transforming growth factor beta), tels que GDF9 (growth differenciation factor 9) ou BMP15 (bone morphogenic protein 15), interviennent dans la croissance du follicule primaire et le passage au stade secondaire. Dès que la taille ovocytaire est stabilisée, la zone pellucide ovocytaire se forme et apparaissent en son sein les Gap Junctions (prolongements cytoplasmiques des cellules de la granulosa). Cette structure permet le dialogue moléculaire entre cellules de la granulosa et ovocyte, relation paracrine indispensable à la croissance folliculaire, au maintien de l'arrêt méiotique ainsi qu'à sa reprise (13).

Dès que la granulosa présente 4 à 6 couches de cellules, le follicule est considéré de type pré-antral. Son diamètre est de 120 à 200 µm et à sa périphérie se différencient des cellules somatiques donnant la thèque. Dès leur formation, les cellules de la thèque expriment les récepteurs à la LH (hormone luteinisante).

La folliculogénèse se poursuit par la croissance antrale caractérisée par la prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa. Les cellules de la granulosa des follicules antraux produisent le liquide folliculaire au sein de petites cavités confluant progressivement : l'antrum se forme.

70 jours environ sont nécessaires à la croissance des follicules pré-antraux (classe 1 taille de 20 à 100 µm) pour atteindre la taille de 2 à 5 mm (classe 5/8) devenant alors recrutables par la FSH d'origine hypophysaire. Au stade antral, la thèque des follicules est bien différenciée : elle est constituée de 2 couches, interne spécialisée dans la production d'androgènes et externe (fibroblastes, cellules musculaires lisses et macrophages) (14). La thèque comprend également un réseau capillaire essentiel à la croissance folliculaire et exposant dès lors le follicule aux facteurs circulants.

Après la quiescence du stade primordial, la croissance folliculaire antrale est l'étape la plus longue de la folliculogénèse, indépendante des gonadotrophines hypophysaires d'une durée estimée à 200 jours chez la femme (1). De nombreux follicules vont entrer en atrésie par apoptose (15). Le taux d'atrésie est le résultat de l'équilibre des facteurs pro- et anti- apoptotiques. La synchronisation du développement folliculaire repose sur un dialogue moléculaire permanent entre les différentes cellules folliculaires essentiel à la régulation de la population antrale (16).

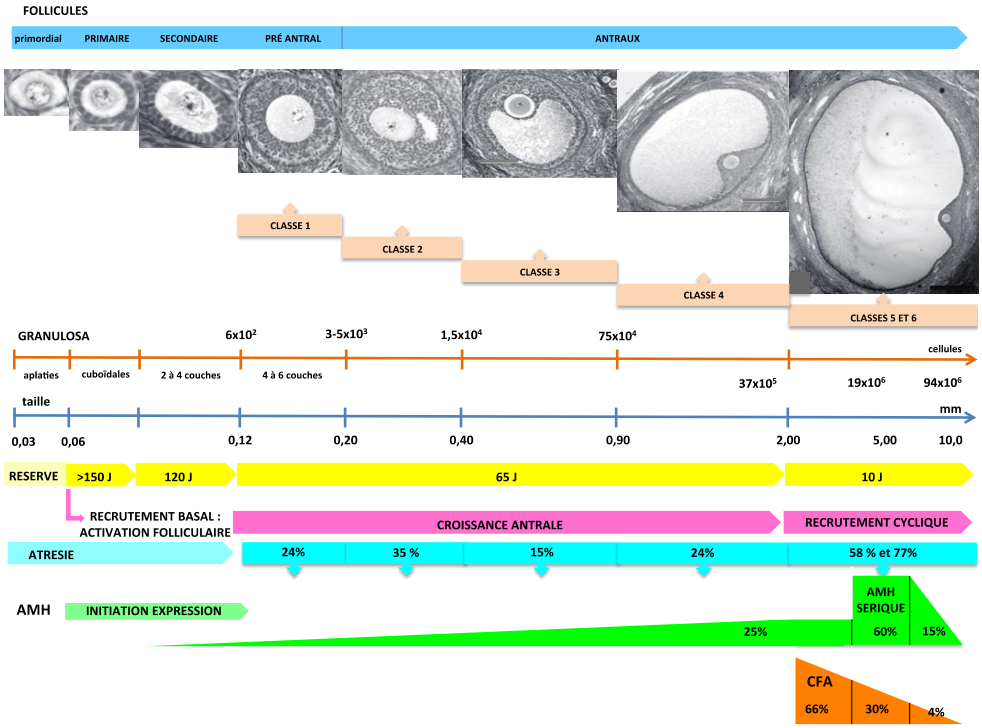


Figure 5 : La folliculogénèse antrale : aspect histologique, classification, diamètre, durée de maturation, taux d'atrésie (10), participation à la concentration sérique d'AMH (17) et proportion évaluée par le CFA (18)

4. Régulation des populations folliculaires primordiale et antrale

a. Activation et quiescence des follicules primordiaux : état des connaissances des voies moléculaires régulatrices

Après la naissance, le nombre de follicules primordiaux présents dans l'ovaire dépend des mécanismes physiologiques régulant les phénomènes de quiescence/activation folliculaire et les signaux de survie/mort cellulaire (19).

Les voies moléculaires impliquées connues à ce jour ont été décrites principalement sur la base d'étude de modèles murins génétiquement modifiés knock-out.

Jusqu'au stade préantral, activation et croissance sont indépendantes des gonadotrophines hypophysaires. L'orientation vers la quiescence ou l'activation des follicules primordiaux est le résultat de l'équilibre relatif de facteurs activateurs et inhibiteurs du recrutement basal. L'activation du follicule primordial se manifeste par la différenciation des cellules de la granulosa suivie de l'initiation de la croissance ovocytaire (20).

La transformation cuboïdale des précurseurs des cellules de la granulosa dépend de l'expression spécifique du facteur transcriptionel Foxl2 (forkhead box 2) par ces mêmes cellules. Néanmoins, en l'absence d'expression de Foxl2 par la pré–granulosa, l'ovocyte s'active prématurement sans maturation préalable de la granulosa conduisant à l'atrésie du follicule concerné (21). La granulosa des follicules primordiaux est donc à l'origine de facteurs ou de signaux inhibant la croissance ovocytaire garantissant la quiescence des follicules primordiaux. Dès lors, le contrôle de la maturation et de la croissance de la granulosa semble être un verrou cellulaire de l'activation folliculaire.

La transformation cuboïdale des cellules de la granulosa s'accompagne de prolifération induite notamment par la liaison des facteurs de croissance de type bFGF (b fibroblast growth factor) et KGF (keratinocyte growth factor) à leurs récepteurs spécifiques exprimés à la membrane des cellules de la granulosa des follicules primordiaux. bFGF provient entre autres des ovocytes des follicules en croissance et KGF par les cellules du stroma ovarien environnant (précurseur des cellules thécales). Dans les cellules de la granulosa, la signalisation de bFGF et KGF conduit également à la synthèse d'un autre acteur majeur de l'activation folliculaire : Kit Ligand (KL).

En effet KL, bFGF et KGF sont des ligands solubles identifiés des récepteurs membranaires ovocytaires de type RTK (récepteur à tyrosine kinase), acteur de la voie des PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase).
La voie des PI3K, ubiquitaire dans la régulation de la survie croissance et migration cellulaire, est une des voies dont l'implication dans l'initiation de la croissance ovocytaire a été démontrée. Cette voie s'active par la phosphorylation du PI3K suite à la liaison de facteurs de croissance aux RTK.

Le PI3K phosphorylé déclenche une cascade de réactions intracellulaires aboutissant à l'inhibition d'un certain nombre de facteurs intracellulaires responsables de la quiescence de l'ovocyte : le follicule peut alors s'activer.

Parmi ces facteurs maintenant la quiescence de l'ovocyte on trouve :
-Foxo3a (connu pour arrêter le cycle cellulaire des cellules somatiques en transition G1/S)
-et P27 (cycline dépendant kinase : inhibitrice de la progression du cycle cellulaire).

Néanmoins, dans le cytoplasme ovocytaire, une phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog) déphosphoryle le phosphatityl inositol : catalysant la réaction inverse de la PI3K. PTEN contre balance l'activation de la voie PIK3 et en ce sens promeut la quiescence folliculaire. La croissance ovocytaire survient certainement lorsqu'un « seuil » des ligands des RTK de la voie des PIK3 dépasse les capacités ovocytaires à maintenir la quiescence (22).

Le récepteur c-Kit ne semble pas être le principal activateur de la voie des PIK3 ou bien cette dernière n'est pas l'unique voie de l'activation ovocytaire des primordiaux : les souris mutées sur le gène codant c-KIT, sans signalisation ovocytaire par PIK3 conservent un activation des primordiaux, sont fertiles et présentent une dépletion accélérée de leur réserve ovarienne (23).

La balance quiescence/activation dépend de nombreux autres acteurs moléculaires (24). Parmi eux, on peut citer des facteurs transcriptionnels spécifiques des cellules germinales primordiales et des follicules primaires :
- SOHLH 1 et 2 (spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix) réprimant l'activation primordiale, et qui contrôlent l'expression de c-KIT GDF9 et de NOBOX:
-NOBOX (newborn ovary homeabox protein) dont l'absence d'expression génique (modèles animaux knok-out) est responsable d'inhibition de l'activation folliculaire conduisant à l'infertilité.

La régulation de l'équilibre quiescence-activation et la synchronisation de l'activation folliculaire repose donc sur un dialogue moléculaire complexe entre les différents compartiments cellulaires ovariens : ovocytes, granulosa et stroma des follicules quiescents et en croissance. In vitro les follicules primordiaux isolés des autres populations folliculaires et de l'environnement ovarien s'activent (25) : cette observation suggère qu'il existe in vivo une inhibition paracrine du recrutement basal.

b. La folliculogénèse antrale : frein paracrine au recrutement basal

Les cellules de la granulosa, les ovocytes et les cellules thécales des follicules en croissance antrale produisent des médiateurs solubles intervenant dans la régulation paracrine de l'activation des follicules primaires. Ces médiateurs sont également indispensables à la poursuite de la croissance antrale, quantitativement nécessaire pour un frein efficace du recrutement basal. Ils appartiennent pour la plupart à la famille des TGF beta. On peut citer le GDF9, les BMP15, 4 et 7 et l'AMH (26).

Les facteurs d'origine ovocytaire

Le GDF9 est synthétisé par les ovocytes des follicules primaires mais aussi par les primordiaux. Les souris KO pour le GDF9 présentent une folliculogénèse arrêtée au stade primaire. Les ovocytes de ces follicules dégénèrent ou présentent des anomalies de la méiose. Le GDF9 soutient donc la croissance antrale. Le BMP15 d'origine ovocytaire y joue aussi un rôle : les brebis invalidées pour ce gène sont stériles avec une folliculogenèse arrêtée au stade primaire (27). Des mutations des gènes codant GDF9 et BMP15 ont été par ailleurs identifiées chez des femmes présentant une insuffisance ovarienne précoce, confirmant l'importance du rôle de ces facteurs dans la régulation de la folliculogénèse (figure 6).

Les facteurs d'origine thécale et stromale

BMP4 et BMP7 sont également impliqués : ils sont synthétisés par les cellules thécales et du stroma ovarien. Chez le rat, BMP7 stimule la conversion des follicules primordiaux en follicules primaires et la prolifération des cellules de la granulosa des follicules antraux (28). En présence de BMP4, des cultures d'ovaires de rat de 4 jours (essentiellement composés de follicules primordiaux et de quelques follicules primaires) présentent une augmentation du nombre de petits follicules en croissance et une diminution du nombre de follicules primordiaux. A l'inverse, en présence d'anticorps anti BMP4, l'apoptose augmente : le BMP4 agirait ainsi comme un facteur de survie des follicules une fois activés (29).

L'hormone anti-müllerienne (AMH) synthétisée par les cellules de la granulosa

Les cellules de la granulosa des follicules antraux sécrètent une hormone, l'AMH dont le rôle dans l'inhibition paracrine de l'activation follicullaire a été démontré : les souris AMH knock-out présentent une augmentation du taux d'activation des primordiaux qui aboutit à une dépletion prématurée de la réserve. Bien que les mécanismes soient indirects du fait de l'absence d'expression du récepteur de l'AMH par les follicules primordiaux, l'AMH possède une place centrale dans l'inhibition paracrine de l'activation, détaillée dans le chapitre suivant (30).

Rôle de la FSH dans le soutien de la folliculogénèse antrale

La population de follicules antraux est donc à l'origine d'un frein au recrutement basal ou activation folliculaire signant le début de la croissance antrale. Si le recrutement basal et la croissance folliculaire antrale peuvent se dérouler normalement en l'absence de FSH (jusqu'au stade petit antral chez des femmes porteuses de mutations invalidant plus ou moins fortement le récepteur de la FSH, ou d'une mutation du gène codant la sous-unité β de la FSH (31)), la FSH a aussi un rôle dans la maturation des follicules pré-antraux en stimulant la prolifération des cellules de la granulosa (32) des follicules sécrétant l'AMH.

Ainsi le début de la croissance folliculaire est essentiellement dépendant de facteurs de croissance locaux, produits par l'ovocyte qui agissent sur les cellules de la granulosa ou inversement. Néanmoins, en soutenant la croissance antrale, la FSH participe indirectement au frein au recrutement basal protégeant le stock de follicules primordiaux, hypothèse étayée par les observations d'Allan sur l'amélioration de la survie des follicules primordiaux murins en présence de FSH (33).

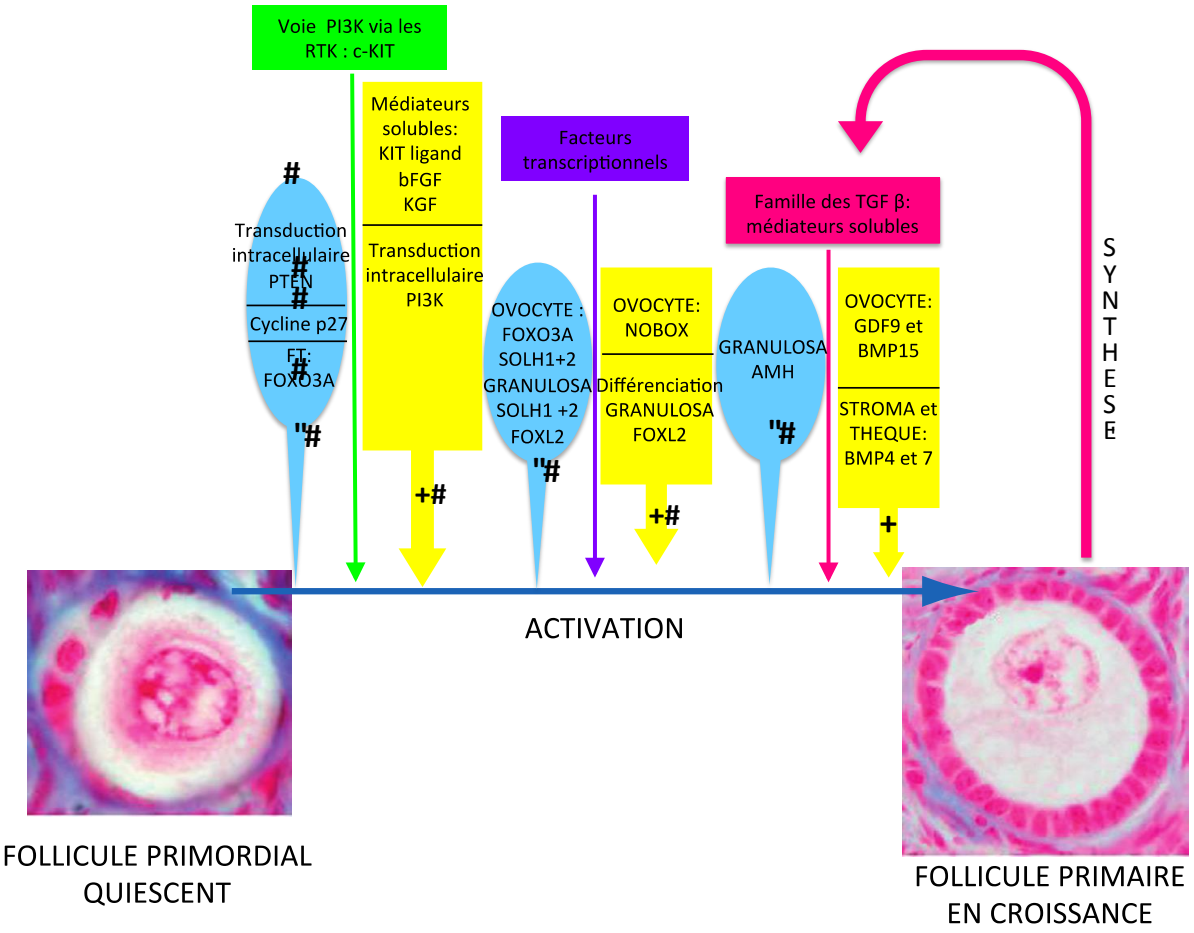


Figure 6 : Régulation de l'activation des follicules primordiaux (adapté d'après (34))

II. AMH : ACTEUR ET MARQUEUR DE LA RESERVE OVARIENNE

L'interdépendance démontrée des populations primordiale et antrale a permis l'émergence d'une hypothèse désormais confirmée : la concentration d'AMH représentative du nombre de follicules pré antraux et antraux est proportionnelle à la réserve de follicules primordiaux présents à un instant donné dans l'ovaire (35), preuve indirecte du rôle paracrine majeur de l'AMH dans l'équilibre dynamique de ces populations folliculaires.

1. AMH : membre de la famille des TGF beta

L'AMH est une glycoprotéine qui tire sa dénomination du premier rôle physiologique décrit : la sécrétion d'AMH par les cellules de Sertoli du testicule de l'embryon mâle permet la régression des canaux de Müller, ébauches embryologiques du futur tractus génital féminin. Elle appartient à la famille de TGFβ codée par un gène situé sur le chromosome 19 bande p13.3 (36).

a. Le gène de l'AMH

Ce gène de 2,75 kb comprend 5 exons. Le cinquième exon comporte les séquences à forte homologie avec les autres gènes de la famille de TGFβ et correspond à la partie C terminale biologiquement active. Le promoteur de l'AMH comprend des sites de liaison des facteurs transcriptionnels GATA, SF1 et SOX9 (37). Non loin des sites d'initiation de la transcription du gène de l'AMH, un estrogen response element a été identifié (38).

b. La protéine

L'AMH, protéine de 560 acides aminés, circule sous forme d'homodimère formée de 2 sous unités liées par des ponts di-sulfures lui conférant un poids moléculaire de 140 kDa (39). Cet homodimère subit un clivage protéolytique activateur séparant la région N terminale de 55kDa (prorégion stabilisant la protéine et potentialisant son activité biologique) et la région C terminale 12,5kDa (région mature active biologiquement reconnue par le recepteur). Seuls 10 à 15% de l'AMH sérique circule sous forme clivée. Le clivage survient à la surface de la cellule cible suite à l'interaction de l'AMH avec son récepteur AMHR-II. La fixation au récepteur induit la dissociation de la pro-région N-terminale et permet de générer le ligand mature exercant son activité biologique (40).

2. Origine de l'AMH : les cellules de la granulosa

Chez la femme, la synthèse de l'AMH est détectée dès la fin de la vie fœtale (36 SA) (41). Sa sécrétion est initiée par les cellules de la granulosa des follicules du stade primaire et perdure jusqu'aux stades antraux où le liquide folliculaire présente une concentration importante d'AMH pouvant dépasser les 1000 ng/mL. Une faible fraction de l'AMH synthétisée est retrouvée dans le sérum, avec une concentration de l'ordre du ng/mL détectable par les techniques actuelles d'analyse. L'AMH sérique présente une demi vie d'environ 28 heures (42).

Au sein d'un même follicule, les cellules de la thèque, de la granulosa et l'ovocyte dialoguent par de nombreux couples molécule/récepteur qui, par transduction d'un signal, modulent la transcription de gènes. Ce dialogue moléculaire autocrine et paracrine intrafolliculaire est indispensable au bon déroulement de la folliculogénèse. L'AMH fait partie des effecteurs moléculaires de la communication cellulaire intra et inter-folliculaire (27).

L'AMH est donc synthétisée par la granulosa : contingent cellulaire essentiel à la folliculogénèse, responsable de la synthèse d'oestrogènes (à partir des androgènes d'origine thécale par action de l'aromatase).La granulosa participe aussi au contrôle de la survie ovocytaire, au maintien de l'arrêt méiotique de ce dernier, à l'activation folliculaire par médiation autocrine au stade primordial (et paracrine de la part des follicules activés), à la croissance ovocytaire ainsi qu'à sa maturation finale précédant l'ovulation (expression des récepteurs à la LH déclenchant l'ovulation).

3. Profil de l'expression ovarienne de l'AMH

L'expression de l'AMH dans l'ovaire humaine est superposable à celle initialement décrite chez l'animal (rongeurs) (43). La synthèse de l'AMH est limitée au follicules antraux : les ovocytes, les cellules thécales, les follicules primordiaux ou en atrésie et l'interstitium ovarien ne l'expriment pas (36). Les premières études basées sur le marquage immuno-histo-chimique de cellules de la granulosa ont montré une expression de l'AMH débutant dès le recrutement basal croissante jusqu'au stade préantral et antral, maximale dans les follicules secondaires et petit antraux (figure 7). D'autres études basées sur le dosage de l'AMH dans le liquide folliculaire ont confirmé que la concentration intrafolliculaire d'AMH est maximale à 3-4 mm de diamètre (≈1000ng/mL) pour diminuer progressivement jusqu'à 8-9 mm (≈400 ng/mL) chutant alors brutalement à un diamètre folliculaire de 10mm avant l'ovulation (<100 ng/mL) (44).

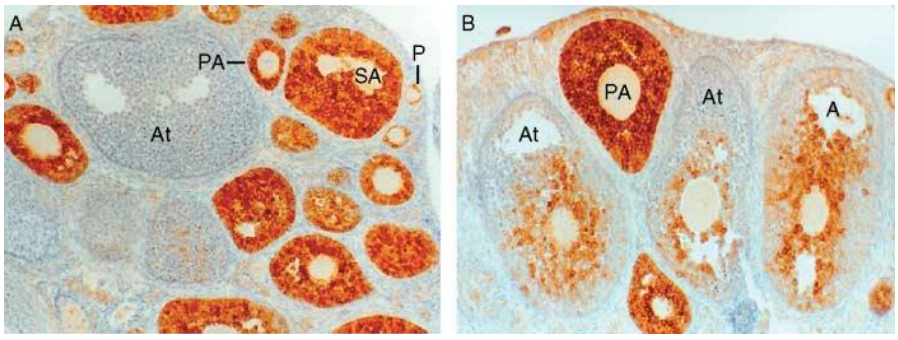


Figure 7 : Coupe d'ovaire de souris : expression de l'AMH marquée en immuno-histo-chimie ; P : primaire ; PA : pré-antral ; SA : petit antral ; A : antral ; At : atrétique (d'après (45))

De plus, si la production d'AMH par les cellules de la granulosa dans les petits follicules primaires est homogène, dans les follicules de grande taille il existe un profil d'expression variable selon les cellules de la granulosa au sein d'un même follicule : l'expression la plus forte étant détectée dans les cellules de la granulosa péri-antrales et péri-ovocytaires. Ce gradient d'expression de l'AMH pourrait être le reflet de la spécialisation fonctionnelle des cellules de la granulosa du follicule dominant où l'expression se restreindra aux cellules du cumulus oophorus avant l'ovulation (46).

Un étude plus récente a mis en évidence par RT-PCR, une expression de l'AMH croissante jusqu'à la taille de 8mm corrélée non pas à la concentration intra folliculaire (décroissante) mais au contenu folliculaire global en AMH rapporté au volume antral. La modélisation mathématique de ce phénomène a confirmé que la cohorte de follicules antraux de 5 à 8 mm contribuent à 60% de l'AMH circulante, contre 25% pour les follicules d'une taille inférieure à 5 mm et 15% pour ceux supérieurs à 8mm (figure 5) (17).

4. Rôle physiologique de l'AMH

L'effet de l'AMH sur sa cellule cible est déclenché par la liaison à ses récepteurs membranaires. L'AMH interagit à la fois avec le récepteur de l'AMH de type II (gène situé sur le chromosome 12) qui lui est spécifique et avec le récepteur de type I commun à d'autres médiateurs solubles de la famille des TGFβ .

a. Récepteurs de l'AMH : signalisation et mécanismes d'action

L'AMH possède 2 types de récepteurs : les récepteurs de type I de la famille des ALK (récepteurs ALK : activine receptor like protein kinase : ALK2, 3 et 6) et le récepteur de type II.

La liaison de l'AMH (fragment C terminal) au récepteur de type II induit le recrutement et la phosphorylation du récepteur de type I. Le tétramère activé phosphoryle les sérines ou thréonines de protéines cytosoliques appelées SMAD (Sma et Mad related proteins) (principaux utilisés : 1 et 5) (47).

Les Smads, au nombre de 8 chez les mammifères, sont réparties en 3 classes en fonction de leurs propriétés structurales et fonctionnelles :

-Les R-Smads (*receptor-regulated Smads*) : Smad 1, 2, 3, 5 et 8, substrats directs des récepteurs de type I activés,

-Les Co-Smads (*common mediator Smads*), dont Smad 4 est le seul membre identifié chez les mammifères, partenaires obligatoires de toutes les R-Smads.

-Les I-Smads (*inhibitory Smads*), Smad 6 et 7, antagonisant la signalisation de type TGF-β.

Les protéines SMAD phosphorylées forment des complexes capables de se transloquer dans le noyau cellulaire, se lient aux SAF (Smad associated factors). Les complexes SMAD-SAF se lient au sein de l'ADN au Smad Binding Element : la transcription de gènes cibles est alors modulée.

Les effets biologiques directs de l'AMH sont donc conditionnés par l'expression des récepteurs de l'AMH. L'AMHR-II est exprimé dans l'ovaire dès sa formation (48). L'expression est homogène dans l'ovaire néonatal puis se retrouve principalement dans les cellules de la granulosa des follicules primaires et pré-antraux ainsi que dans les cellules thécales (36). Les effets biologiques qui concernent l'ovocyte et les follicules primordiaux décrits dans les études de modèles murins knock-out sont donc en partie indirects.

b. Effets biologiques de l'AMH sur la folliculogénèse

Que le mécanisme soit direct ou indirect, les effets de l'AMH concernent deux étapes clés de la folliculogénèse : le recrutement basal ou activation folliculaire et le recrutement cyclique suivi de la sélection folliculaire. Les cibles directes ou indirectes de l'AMH identifiées à ce jour sont les gènes de l'aromatase (49), du récepteur à la LH et à la FSH (50), de KL (51) et Id3 inhibiteur de différenciation des cellules de la granulosa immatures (52)

En 1999, l'équipe de Durlinger a étudié les effets de la suppression du gène de l'AMH dans un modèle murin AMH knock-out repris par la suite par d'autres équipes. Durlinger met alors en évidence une diminution plus rapide du nombre de follicules primordiaux avec l'âge associée à un nombre augmenté de follicules en croissance antrale en période prébubertaire et adulte : le taux de recrutement basal des follicules primordiaux est augmenté : l'épuisement de la réserve de primordiaux est accéléré (30).

L'AMH participe donc à la régulation de l'initiation de la croissance folliculaire antrale. Sur la base de l'observation de la proportion de follicules en croissance dans des cultures d'ovaires de rat en présence d'AMH seule, de KL/ bFGF seuls et associés à de l'AMH, l'AMH est capable d'inhiber l'action de ces facteurs de croissance indispensables à l'activation folliculaire. Dans ces mêmes conditions de cultures, l'étude du transcriptome montre qu'en présence d'AMH, l'expression de nombreux gènes est modulée. Effectivement, sous traitement par AMH, si l'expression de KL et bFGF n'est pas modifiée, l'expression de leurs récepteurs spécifiques est diminuée. Par ailleurs, cette étude montre également que l'AMH diminue l'expression de GDF9 et BMP4 et 15 connus pour promouvoir l'activation folliculaire et la croissance antrale (53)(10). L'AMH pourrait ainsi ralentir la croissance antrale.

Par ailleurs, chez les souris AMH knock-out, l'augmentation du recrutement basal ne s'accompagne pas d'une augmentation du taux d'ovulation qui reste normal. Une augmentation de l'involution ovocytaire et de l'atrésie folliculaire antrale est effectivement constatée (54). L'AMH participe donc à la régulation de la croissance et de la survie des follicules antraux (figure 8).

Il est communément admis que l'AMH contrôle le recrutement cyclique en diminuant la sensibilité des follicules pré-antraux et antraux à la FSH (55) par répression de l'expression des récepteurs à la FSH (50). Il semblerait qu'au début de

la croissance antrale, le contrôle folliculaire par la réceptivité aux BMP soit responsable de la forte expression de l'AMH (56). Cette forte expression de l'AMH par les cellules de la granulosa inhibe l'aromatase et l'expression des récepteurs à la FSH. Ceci pourrait expliquer la relation inverse que l'on constate entre la concentration d'AMH intrafolliculaire et celle d'estradiol couplée à l'expression de l'aromatase (57). En fin de croissance folliculaire, l'expression de l'AMH diminue. La taille de 8mm correspond à l'inversion de l'expression du rapport estradiol/AMH. L'expression des récepteurs à la FSH pourrait augmenter sensibilisant le follicule à cette dernière : la FSH stimule alors l'aromatase, la concentration d'oestrogènes dépasseraient un seuil, responsable (via les recepteurs beta) de l'entretien d'une inhibition de la synthèse de l'AMH par mise en jeu de l'ERE (estrogen response element) présent sur le promoteur de cette dernière (58). Au sein de la cohorte de follicules recrutés par la FSH, la diminution de l'expression de l'AMH ne serait pas la même pour tous les follicules. Le follicule sélectionné pour la dominance et l'ovulation, pourrait être le follicule exprimant le moins l'AMH, permettant une augmentation de la sensibilité aux gonadotrophines antéhypophysaires et la synthèse d'oestradiol. Le follicule sélectionné connaît alors la croissance maximale, les cellules de la granulosa proliférantes synthétisent une quantité croissance d'oestrogènes induisant le pic de LH nécessaire à l'ovulation.

Si l'AMH est le reflet de la population folliculaire antrale, elle n'en est pas moins un acteur essentiel orchestrant la décélération de l'épuisement physiologique de la réserve primordiale.

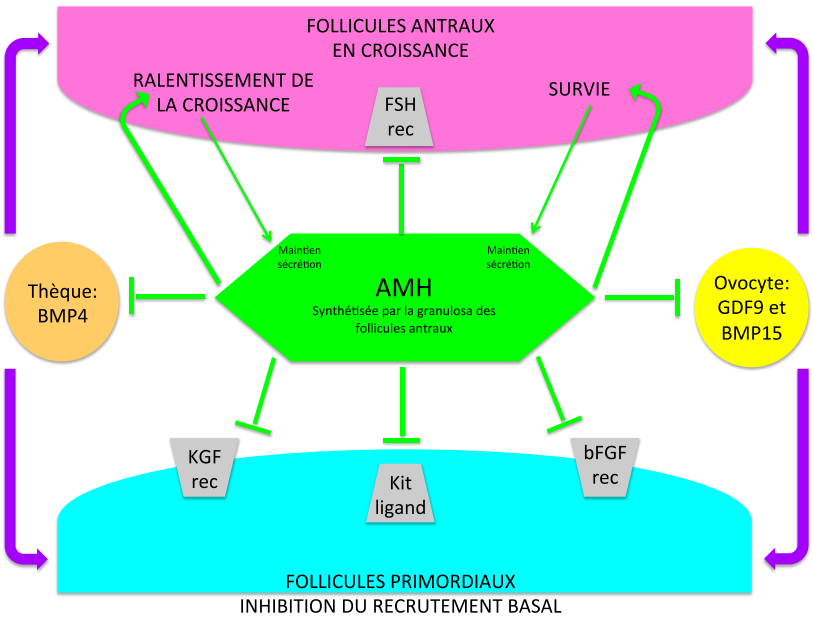


Figure 8 : Rôle de l'AMH dans la régulation de l'équilibre entre population folliculaire antrale et primordiale

5. AMH : Marqueur de réserve ovarienne

a. âge

La compréhension des mécanismes de régulation de la folliculogénèse laisse donc supposer une proportionnalité des effectifs de follicules primordiaux et antraux : hypothèse confirmée par de nombreuses études (10). Le compte folliculaire antral (CFA) échographique a été la première méthode non invasive disponible pour l'évaluation du nombre de follicules antraux. La corrélation entre concentration d'AMH et CFA a été démontrée (59) , le dosage d'AMH permettant de s'affranchir partiellement de la variabilité d'appréciation opérateur dépendant du CFA.

La diminution parallèle des populations antrale et primordiale liées à la déplétion physiologique se manifeste in fine par l'augmentation de la FSH liée à l'impossibilité de sécrétion d'oestrogènes ovariens assurant le rétrocontrôle sur l'hypothalamus et l'hypophyse. La diminution de concentrations sériques d'AMH est plus précoce que les perturbations du bilan hormonal classique (FSH, estradiol). Une étude récente de Hansen en 2011 de pièces d'ovariectomie pour causes gynécologiques a réaffirmé la forte corrélation entre AMH, CFA et nombre de follicules primordiaux après ajustement sur l'âge (35).

Les différentes méthodes d'évaluation de la réserve de follicules primordiaux (histologiques, échographiques ou dosage biologique) ont permis d'appréhender la cinétique de décroissance du stock folliculaire correspondant au vieillissement ovarien normal lié à l'âge du fait du recrutement basal actif de la naissance à la ménopause.

A la naissance l'AMH est quasiment indétectable chez la femme. A l'occasion de la minipuberté néonatale (jusqu'à l'âge de 3 mois), l'augmentation transitoire des gonadotrophines témoignant d'une activation de l'axe hypothalamo-hypophyso gonadique expliquerait la brève ascension des concentrations d'AMH circulante (liée à une stimultation par la FSH). L'AMH chute ensuite pour amorcer une lente augmentation à partir de l'âge de 2 ans. En période péri pubertaire, l'AMH fluctue : la tendance globale est à l'augmentation. La croissance des concentrations d'AMH est accélérée à la puberté malgré des fluctuations du fait des variations de l'équilibre entre les populations folliculaires. Le pic d'AMH est atteint entre 16 et 25 ans, pic à partir duquel la diminution de l'AMH sérique correspond à la perte progressive du pool de follicules primordiaux et au déclin des fonctions reproductives (figure 9). Plusieurs normogrammes de l'AMH ont été publiés dans la littérature (60)(61). La diminution annuelle du taux d'AMH calculé d'après des modèles mathématiques est de l'ordre de 5,6% par an après 21 ans (18). On constate une accélération du recrutement basal et de la décroissance de l'AMH quelques années avant la ménopause, témoignant de l'insuffisance du frein paracrine accélérant la déplétion folliculaire. 3 à 5 ans avant la ménopause, l'AMH est indétectable (62) faisant de ce marqueur un candidat à la prédiction de l'âge de la ménopause (63).

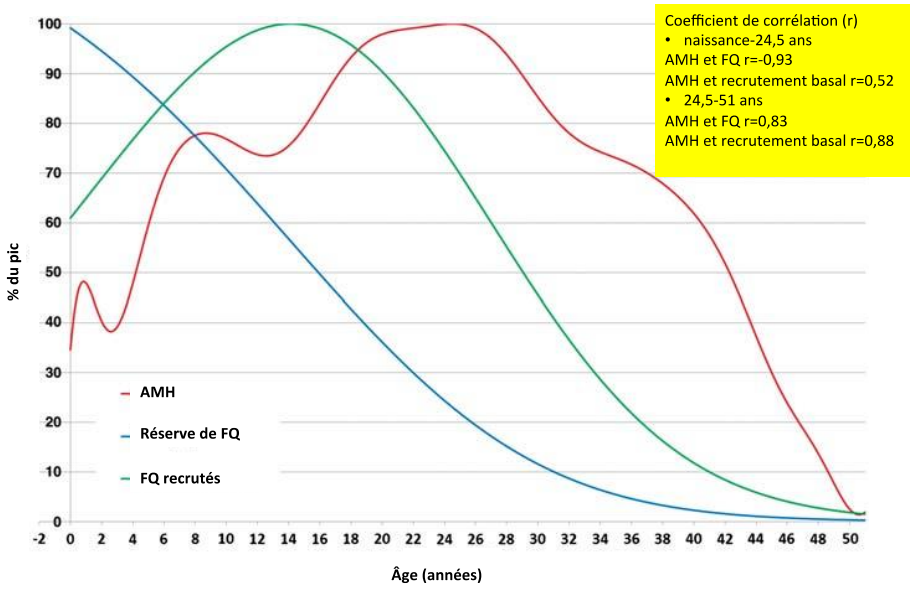


Figure 9 : Evolution de la concentration d'AMH, de la réserve en follicules primordiaux et du recrutement basal de la naissance à 51 ans d'après (64)

b. Facteurs de variation de l'AMH (en dehors de l'âge)

Variabilité inter-individuelle et cycle menstruel

L'AMH n'étant ni sécrétée par le follicule dominant ni par le corps jaune, la croissance antrale étant indépendante des gonadotrophines hypophysaires, la plupart des études font état de la stabilité de la concentration de l'AMH au cours du cycle menstruel (65,66). La variation intra-individuelle est faible de l'ordre de 11% et 72% des femmes présentent des variations de concentration de l'AMH situées dans le même quintile (67).

Néanmoins, le sujet reste controversé : par exemple une variabilité intra-individuelle allant jusqu'à 80% a été retrouvée dans une étude en 2013 (68) caractérisée par une réduction importante des quantités d'AMH circulante en phase lutéale confirmant les résultas de Wunde (69).

Les résultats de Sowers et al. distinguent deux profils d'expression de l'AMH en fonction de l'âge de l'ovaire. Dans l'ovaire jeune, les valeurs observées de l'AMH sont hautes et s'accompagnent des fluctuations significatives pendant le cycle menstruel sans lien avec les phases folliculaires ou lutéales. Avec le vieillissement ovarien, la diminution des concentrations d'AMH irait de pair avec des variations intracycles plus faibles (70).

Ethnie

Des études américaines rapportent des variations « éthniques » : à un âge donné, les concentrations d'AMH chez les femmes d'origines hispanique et afro-américaine sont inférieures à celles mesurés chez les femmes d'origine caucasienne. Dans ces cas, il existe une moins bonne corrélation entre le compte folliculaire antral et la concentration d'AMH sérique (71) (72).

Contraception oestro-progestative

Les contraceptifs oestro-progestatifs en tant que suppresseur ovarien ont également un impact sur les concentrations sériques d'AMH. Après mise sous contraception, les concentrations d'AMH sont plus faibles (-30%) que chez des femmes de même âge sans contraception (73) A l'arrêt, l'AMH retrouverait son niveau basal pré-contraceptif en quelques cycles En 2013, l'essai randomisé sur plus de 2000 femmes de Dolleman montre une diminution de 50% quelque soit le mode de contraception utilisé (74).

Grossesse et pré-éclampsie

Les deuxième et troisième trimestres de grossesse sont marqués par une diminution des concentrations d'AMH. (50% entre la conception et l'accouchement) (75)(76). L'hémodilution, l'augmentation de la fixation protéique et une réduction du nombre de follicule en croissance antrale pourrait expliquer cette variation, résolutive dans le post-partum.

Après une pré-éclampsie, les concentrations d'AMH ne rétrouvent pas leur niveau péri-conceptionnel, suggérant le rôle important du soutien vasculaire de l'ovaire à la survie folliculaire (77).

Tabac

Concernant l'effet du tabagisme sur les concentrations d'AMH, les études publiées sont contradictoires : réduction pour certaines (78,79) alors que d'autres sont en faveur de taux inchangés (80,81). La récente étude de Dolleman de 2013 sur 2000 patientes confirme la réduction des taux d'AMH en cas de tabagisme (74).

Indice de Masse Corporelle

L'augmentation de l'indice de masse corporellle serait corrélée à une diminution des concentrations d'AMH circulante (82,83) même si des études évoquent l'âge et le syndrome des ovaires polykystiques comme facteurs confondants (81,84).

III. LE CANCER DU SEIN : épidémiologie et oncogénèse

1. Epidémiologie

Le cancer du sein est le cancer de la femme le plus fréquent dans le monde : les données du programme GLOBOCAN publiées par l'IARC font état d'une augmentation mondiale de 20% de l'incidence de ce cancer entre 2008 et 2012. Pour l'année 2012 en France, l'InVS rapporte 48763 nouveaux cas pour 11 886 décès toutes classes d'âge confondues (figure 10). Le vieillissement de la population et les facteurs de risque associés au mode de vie occidental expliquent pour beaucoup cette évolution. En Europe, la tendance est identique (prévalence européenne mesurée en 2003 à 1377/100000 habitants contre 916 en 1993) avec une prévalence nettement supérieure à l'incidence liée à l'amélioration des modalités des dépistage diagnostic et traitement (85). Toutefois, depuis les années 2000, les taux d'incidence diminuent en France et aux Etats-Unis d'Amérique, évolution certainement imputable à la diminution de la prescription des traitements hormonaux substitutifs de la ménopause.

Pour les femmes de moins de 40 ans, la situation est différente. Certaines études constatent une augmentation de l'incidence du cancer du sein dans cette catégorie d'âge (86), alors que les taux enregistrés depuis 20 ans dans l'ensemble des pays occidentaux sont relativement stables (87). Malgré un pronostic qui reste moins favorable, cette catégorie d'âge a particulièrement bénéficié des progrès thérapeutiques connaissant ainsi une diminution du taux de mortalité (88).

Aujourd'hui, environ 5% des diagnostics de cancer du sein sont établis chez des femmes âgées de moins de 40 ans et un diagnostic du cancer du sein sur 40 concerne une femme de moins de 35 ans (89).

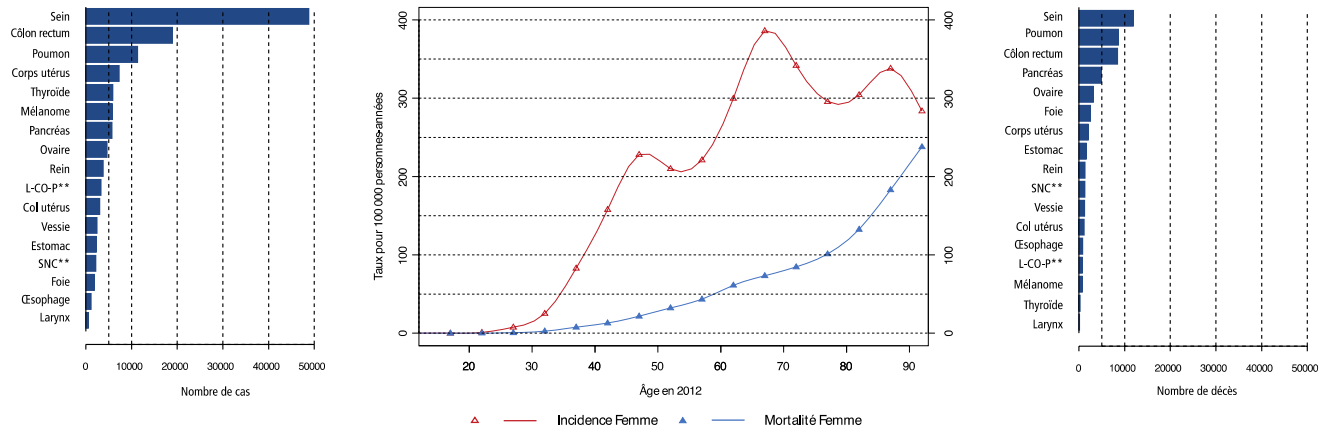


Figure 10 :
Estimation du nombre de cas incidents et de décès par localisation en France en 2012 chez la femme.
Incidence et mortalité du cancer du sein en fonction de l'âge en France en 2012 (au centre).
Données InVS (90).

2. Présentation clinique et circonstances du diagnostic

Avant la mise en place du dépistage mammographique, la palpation par les patientes d'une masse mammaire non douloureuse était la principale circonstance de découverte d'un cancer du sein. Le dépistage recommandé par l'union européenne est en place dans 18 pays et a permis de réduire la mortalité du cancer du sein (prouvée pour les 50-69 ans) (91)(92). La détection de lésions infra cliniques est de meilleur pronostic.

Chez les femmes de moins de 40 ans sans antécédents familiaux, l'incidence faible de ce cancer ainsi que le risque de l'exposition cumulée aux radiations ionisantes contre-indiquent le dépistage mammographique (93). Le temps de doublement des tumeurs mammaires des femmes jeunes est raccourci par rapport aux femmes plus âgées. Dans une étude rétrospective ayant porté sur 628 femmes de moins de 40 ans, 71% des tumeurs ont été détectées par autopalpation (taille moyenne de 2 cm) (94). La plupart des diagnostics de cancer du sein chez la femme jeune sont ainsi symtomatiques, palpables et donc de stade plus avancé.

Néanmoins, une partie de ces femmes jeunes sont ou devraient être diagnostiquées à des stades plus précoces en cas de facteurs de risques justifiant une surveillance rapprochée. Ces facteurs de risques sont principalement des prédispositions génétiques dont font partie les mutations des gènes BRCA 1 et 2 (BReast CAncer) (95).

3. Anatomie et Physiologie mammaire

a. Anatomie

Le sein comporte dix à quinze canaux galactophores s'abouchant aux niveaux des pores mamelonnaires après la dilatation du sinus lactifère. En amont de chaque canal galactophore se trouvent des ramifications : les canaux secondaires conduisant in fine aux lobules. L'arborescence naissant de chaque canal galactophore forme une structure anatomique pyramidale à sommet mamelonnaire appelé lobe. L'unité terminale ducto lobulaire correspond à la dernière ramification galactophorique extra lobulaire et son lobule attenant. Ce canalicule extra-lobulaire se prolonge par le canalicule intralobulaire dans lequel se drainent plusieurs canalicules terminaux ou acini ou alvéoles (figure 11). La lumière des acini, plus large que celle des canaux est délimitée par une paroi constituée d'un épithélium à fonction sécrétrice reposant sur des cellules myoépithéliales à activité contractile. Une membrane basale sépare l'acinus du tissu palléal (tissu conjonctif environnant lâche délimitant le lobule du tissu de soutien mammaire environnant) Différentes classes de lobes sont identifiables : 1 à 4. La classe 4, différenciation maximale obtenue pendant la grossesse pour la lactation, contient le plus grand nombre de lobules (96).

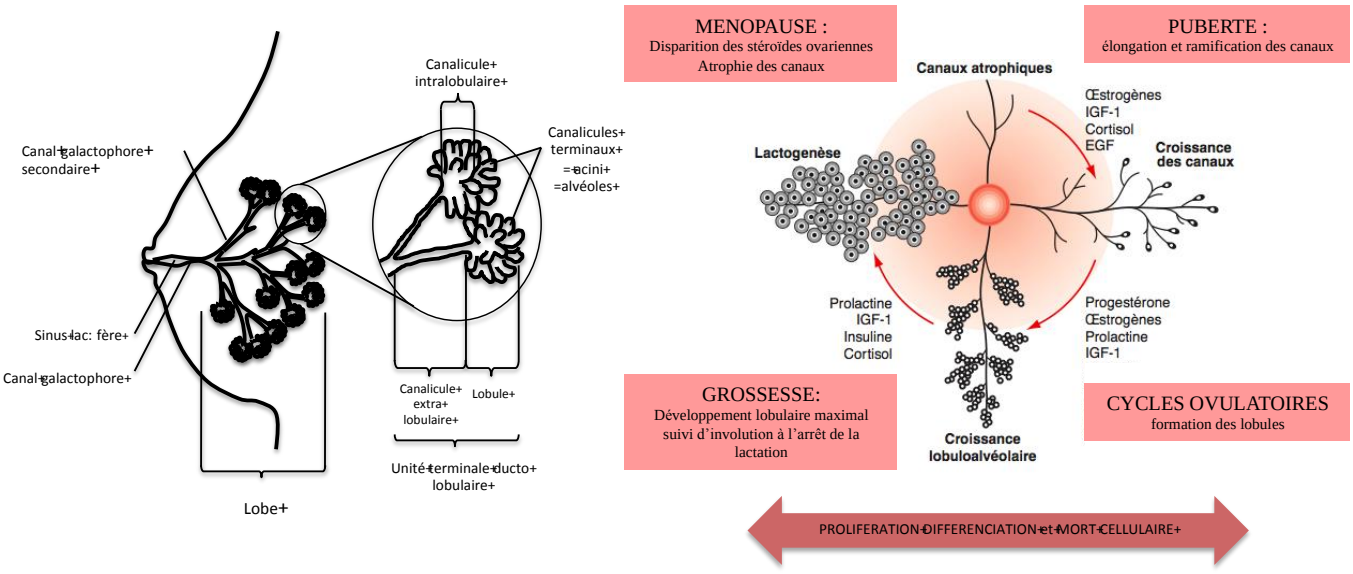


Figure 11 : Anatomie et physiologie mammaire d'après (97)

b. Physiologie

Le sein est une glande exocrine spécialisée dans la production du lait après l'accouchement. Pendant l'embryogenèse, une glande primitive d'origine ectodermale se forme dans le mésenchyme devant le gril costal et se différencie au troisième trimestre de grossesse sous l'influence des hormones maternelles. Chez le foetus mâle, des androgènes d'origine testiculaire inhibent le développement mammaire. A la puberté, oestradiol et facteurs de croissance stimulent le sein : le stroma se développe puis le tissu glandulaire (élongation et ramification des canaux avec les bourgeons alvéolaires à l'origine des lobules, unité fonctionnelle). Avec les cycles ovulatoires, les lobules se forment : les sécrétions hormonales alternées d'oestradiol seul puis de progestérone associée aux oestrogènes sont à l'origine de la prolifération des cellules épithéliales au sein des bourgeons terminaux avec diminution de la lumière des acini. En phase lutéale, la lumière des acini se dilate , la prolifération s'arrête, les cellules myoépithéliales se vacuolisent et apparaît un oedème du tissu conjonctif (97).

Pendant la grossesse, jusqu'au cinquième mois la prolifération cellulaire est intense : au sein des lobules, le nombre et la taille des acinis augmentent.

Après l'accouchement, suite à la chute des oestrogènes et progestérone, la prolactine déclenche la lactation : les sécrétions distendent les acinis. Le lait est conduit par les canaux galactophores. En l'absence de succion du mamelon, la glande régresse. Cette régression est médiée par une intense activité de mort cellulaire programmée.

La disparition des stéroïdes sexuels à la ménopause conduit à la diminution des acinis par atrophie épithéliale, épaississement de la membrane basale et involution fibro-adipeuse (figure 11) (98).

c. *Prolifération et différenciation de l'épithelium mammaire*

Tout au long de la vie, la glande mammaire est le siège d'importantes modifications que ce soit pendant la puberté, le cycle menstruel, la grossesse, le post partum, l'allaitement et l'involution mammaire qui s'ensuit. Trois mécanismes cellulaires sous-tendent ces variations physiologiques: prolifération, différentiation et mort cellulaire. Leur dérégulation concourt à l'apparition des tumeurs mammaires.

Les extrémités des canaux galactophores sont le siège de la prolifération et de la différenciation épithéliale mammaire permettant le développement de la glande. Le bourgeon terminal constitué à son apex de cellules souches mammaires est l'entité fonctionnelle responsable de ce phénomène. Le pool de cellules souches mammaires est maintenu par division symétrique. La division asymétrique permet la différenciation en cellule épithéliale luminale sur le versant interne du bourgeon ou myoépithéliale sur le versant externe. La lumière est crée par apoptose des cellules internes non différentiées. Le bourgeon progresse dans le stroma mammaire grâce à l'action d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (99).

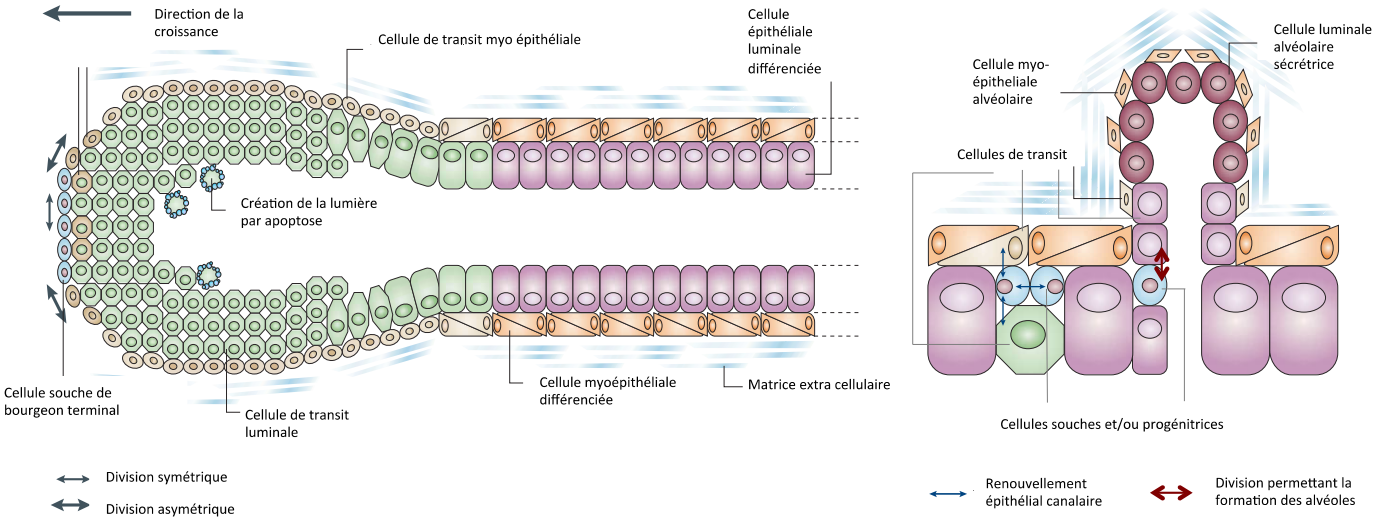


Figure 12 :
Implication des cellules souches mammaires dans la prolifération et la différenciation de l'épithélium mammaire au sein du bourgeon terminal et des canalicules formés d'après (99)

Dans le tissu épithélial mammaire, quelques cellules souches persistent entre les couches luminales et myoépithéliales formant le compartiment de cellules souches adultes mammaires disséminé dans la glande. Via les cellules progénitrices, elles permettent le renouvellement de l'épithélium canalaire (cellules luminales et myoépithéliales) mais aussi la constitution des acini (différenciation en cellules épithéliales luminales sécrétrices) (figure 12) (100).

L'homéostasie du tissu mammaire est donc le résultat de l'équilibre entre les processus de prolifération, différenciation et mort cellulaire soumis à la régulation du cycle cellulaire, de l'expression génique et de l'apoptose.

L'expression de protéines impliquées dans cette régulation est modulée par les stéroïdes sexuels dont la synthèse est principalement ovarienne. En effet, les cellules souches et différentiées mammaires notamment au sein de l'unité ducto lobulaire terminale expriment les récepteurs aux oestrogènes et à la progesterone.

Les oestrogènes ont une action pro-proliférante sur les cellules épithéliales normales. Ils ciblent des gènes responsables de l'entrée dans le cycle cellulaire et stimulent aussi la production de facteurs de croissance dont l'IGF (insuline like growth factor). Ils ont également une action anti-apoptotique et inhibent la différenciation épithéliale.

La progestérone possède un effet anti prolifératif en agissant sur la phase G1 du cycle cellulaire. Elle diminue la synthèse des cyclines impliquées dans sa progression et augmente la synthèse des inhibiteurs des kinases cyclines dépendantes à l'origine d'un arrêt de la cellule en phase G1. La progestérone promeut l'apoptose mais stimule également la différenciation épithéliale par contrôle l'expression des gènes impliqués. Elle agit sur la biodisponibilité des oestrogènes pour les cellules mammaires en diminuant l'expression de leurs récepteurs et en stimulant la 17 beta hydroxystéroïde deshydrogénase qui transforme l'oestradiol en oestrone (inactif sur les récepteurs aux oestrogènes) (97).

Les effets des stéroïdes sexuels sur le tissu mammaire sont apparemment antagonistes. Néanmoins les variations cycliques des sécrétions leur confèrent un rôle synergique dans le maintien de l'homéostasie du sein, la progestérone n'étant efficace que sur un tissu préalablement imprégné d'oestrogènes. Le sein est donc un organe sous la dépendance des stéroïdes sexuels ovariens.

4. Oncogénèse mammaire et oestrogènes

a. Modèles

Les tumeurs mammaires sont des tumeurs épithéliales. Différents modèles de transformation maligne ont été proposés notamment par Moolgavkar ou Russo, partageant le concept d'une accumulation de mutations génétiques oncogéniques en plusieurs étapes. La probabilité de survenue de ces erreurs génétiques étant plus élevée dans un tissu en prolifération, un déséquilibre hormonal avec hyperoestrogénie est un facteur promoteur de cancérogénèse alors que l'ultime différenciation mammaire obtenue pendant la grossesse protège de l'apparition tumorale. De même, des mutations constitutionnelles sur des proto-oncogènes ou des gènes supresseurs de tumeurs (exemple de BRCA1 et 2) peuvent accélérer la transformation maligne mammaire.

Bien qu'indispensables à l'expansion physiologique de la glande et au renouvellement épithélial, les cellules souches mammaires par définition

indifférenciées sont présumées être à l'origine des tumeurs mammaires du fait de leur longue durée de vie et d'une forte capacité de prolifération. Les modèles animaux basés sur l'ovariectomie, l'administration d'inhibiteurs de l'aromatase ou d'oestroprogestatifs ou encore l'invalidation du gène de l'aromatase ont démontré leur sensibilité aux stéroïdes sexuels (99). Au sein des tumeurs mammaires, une sous population de cellules CD44+/CD24- indifférenciée expriment des marqueurs de pluripotence (Oct4) et d'auto-régénérescence (voie de signalisation Hedgehod). Ces cellules sont considérées comme les cellules souches cancéreuses mammaires (BCSC), seules cellules à capacité tumorigène en situation de xenogreffe (101,102).

La BCSC sont impliquées dans les phénomènes de résistance thérapeutique : sous chimiothérapie ou radiothérapie, les tumeurs mammaires s'enrichissent en cellules CD44+/CD24-. Sans que les mécanismes soient aujourd'hui caractérisés, une telle résistance aux traitements soutient l'hypothèse de leur rôle dans la récidive tumorale. Les BCSC donnent aux tumeurs mammaires leur pouvoir métastatique : elles sont dotées d'une motilité augmentée et surexpriment les gènes reconnus responsables de métastases. Ainsi l'injection intracardiaque des BCSC chez la souris est responsable de l'apparition de tumeurs disséminées, phénomène non observé en cas d'injections de cellules cancéreuses mammaires non souche (103).

Plusieurs hypothèses quant à l'origine des BCSC existent. Elles pourraient résulter :
-d'une transformation oncogénique directe des cellules souches mammaires saines donnant une BCSC se différenciant secondairement
-de cellules progénitrices plus ou moins différenciée ayant acquis des mutations oncogènes et recevant des signaux inducteurs en cellules souches correspondant à une transformation épithélio-mésenchymateuse (surexpression des acteurs de la voie de signalisation responsable démontrée).
Selon l'orientation de la différenciation de la cellule touchée par la transformation cancéreuse, les différents types moléculaires connus du concer du sein sont observés(104).

b. L'implication des oestrogènes dans la carcinogénèse mammaire

Physiologie, oncologie mammaire et fonction ovarienne sont liées : chez les femmes jeunes de moins de 35 ans, la diminution de 75% de l'incidence du cancer du sein après ovariectomie est un argument majeur du rôle carcinogène des oestrogènes sur le tissu épithélial mammaire (105,106). La physiopathologie de cette carcinogènèse a été par la suite décrite et ses mécanismes se sont révélés à la fois dépendants et indépendants des récepteurs aux oestrogènes (107).

En stimulant la prolifération épithéliale notamment dans l'unité ducto lobulaire terminale (site présumé de l'initiation tumorale), la liaison œstrogène-récepteurs augmente indirectement la probabilité de survenue de mutations (proto-oncogènes ou gène suppresseur de tumeur) ou de recombinaisons mitotiques lors de la réplication. Chez les souris mutées pour Wnt 1 (oncogène mammaire), le délai de survenue des tumeurs est court de l'ordre de 5 mois chez les souris non invalidées pour le récepteur aux oestrogènes (RE+/+) contre 11 mois chez les souris RE-/- (108).

Néanmoins l'administration d'œstrogènes augmente l'incidence des tumeurs mammaires chez les souris ovariectomisées et knock-out pour le récepteur aux oestrogènes (109). De même chez les femmes BRCA 1 ou 2 muté, alors que la proportion de tumeurs mammaires RE+ n'est que de 10 à 24%, l'ovariectomie fait chuter de moitié l'incidence du cancer du sein (110). Il existe donc une oestro-carcinogénèse mammaire indépendante des récepteurs probablement liée aux métabolites des oestrogènes.

En effet, in vivo les oestrogènes subissent des oxydations par des cytochromes P450 (expression prouvée dans le sein) à l'origine de 2-OH et 4-OH-E2 (2 et 4-hydroxy-estradiol) (111). Dans des cultures in vitro de cellules mammaires n'exprimant pas les RE, l'exposition au 4 OH-oestradiol induit des mutations ponctuelles de l'ADN, des pertes d'hétérozygotie fréquemment retrouvées dans les tumeurs mammaires, et des gains ou pertes de segments chromosomiques. Ces composés oxydés sont donc génotoxiques avec un plus fort pouvoir carcinogène pour le 4-OH-E2. (112)

Les 2-OH-E2 et surtout les 4-OH-E2 peuvent être à nouveau oxydés et donner des dérivés quinones eux même génotoxiques. Ils forment avec la guanine et l'adénine des adduits dépurinants. Des processus de réparation de l'ADN interviennent mais le risque élevé d'erreur occasionne des mutations lors de la réplication (113).

Dans l'étude de Gaidwak, les femmes atteintes de cancer du sein ou classée à haut risque présentent une élévation des concentrations urinaires d'adduits E2-quinones-base azotée nucléique comparée à des femmes évaluées à risque standard de cancer du sein (114).
En cascade les E2-quinones elles mêmes peuvent participer à des cycles d'oxydoréduction générant des radicaux libres de l'oxygène, génotoxiques.

Il existe dans l'organisme des mécanismes de détoxification des métabolites des oestrogènes liés à l'action d'enzymes codées dans le génome : ainsi un SNP diminuant l'activité du cytochrome P450 incriminé a été associé à une diminution de 34% du risque de cancer du sein (OR=0,66 p=0,04) (115). La baisse de l'activité de la COMT (cathéco-o-méthyl-transférase transformant les OH-E2 en composés non génotoxiques) conjuguée à la perte des GST (gluthation S transferase) est associé à un risque relatif de cancer du sein de 4,1 notamment chez les femmes en âge de procréer (116).

Le cancer du sein survient donc sur un terrain génétiquement prédisposé : la justification de l'hormonothérapie en cas de tumeur exprimant les RE repose sur des études démontrant la diminution des taux de récidive et d'apparition de tumeur controlatérale. Toute intervention humaine réexposant le sein aux effets des oestrogènes est donc portentiellement à risque.

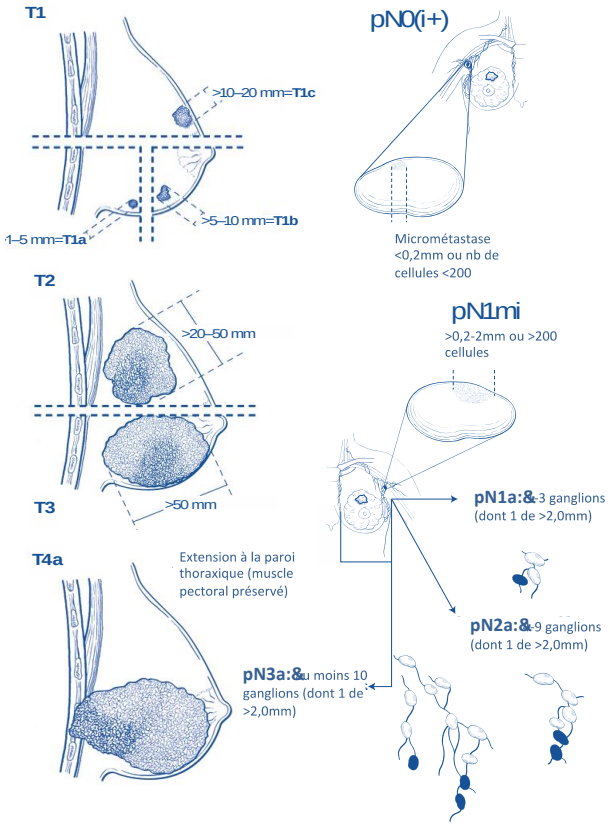
IV. PRISE EN CHARGE DU CANCER DU SEIN

1. La classification des tumeurs mammaires

Au diagnostic, la tumeur est cotée selon différentes classifications. Ces classifications sont essentielles à l'adaptation de la stratégie thérapeutique proposée à chaque patiente suite à une décision collégiale en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP).

a. Classification TNM

Le bilan d'extension permet de décrire la tumeur selon la classification TNM de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) avec appréciation du stade selon l'American Joint Committee on Cancer (AJCC).
Les critères TNM correspondent à :
-la masse tumorale en place et son extension locale (T: tumor)
-l'extension loco-régionale avec l'envahissement des ganglions (N: node)
-l'extension à distance avec le développement de métastases (M : metastasis)
Chaque critère est associé à un chiffre dont la valeur augmente avec la gravité. Les tumeurs sont ensuite regroupées par stade : 0 pour les cancer in situ à IV pour les cancers métastatiques.



CLASSIFICATION TNM et STADE selon l'AJCC			
STADE 0	Tis	N0	M0
STADE IA	T1*	N0	M0
STADE IB	T0	N1mi	M0
	T1*	N1mi	M0
STADE IIA	T0	N1**	M0
	T1*	N1**	M0
	T2	N0	M0
STADE IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
STADE IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
STADE IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
STADE IIIC	Any T	N3	M0
STADE IV	Any T	Any N	M1

AGGRAVATION DU PRONOSTIC

*Micrométastase incluse ** micrométastase exclue

Figure 13 : Classification TNM et stade selon l'AJCC (117)

L'examen anatomo-pathologique de la biopsie puis de la tumeur établit le diagnostic selon la classification histologique de l'OMS et la classification moléculaire basée sur l'expression de différents marqueurs (immunohistochimie).

b. Classification histologique

Les tumeurs mammaires sont principalement des tumeurs épithéliales (98%) communément dénommées adénocarcinomes. Schématiquement, l'examen histologique distingue :

- les carcinomes infiltrants des non infiltrants (in situ) selon le franchissement de la membrane basale et l'envahissement du tissu conjonctif sous-jacent
- les carcinomes canalaires ou lobulaires selon la localisation histologique et la cohésion des cellules épithéliales mammaires malignes confirmée par le marquage de la E-cadhérine synonyme de carcinome canalaire.

On dénombre ainsi :
-70% de carcinomes canalaires infiltrants,
-5 à 15 % des carcinomes lobulaires infiltrants.
-4% de carcinomes canalaires in situ souvent caractérisés par des microcalcifications à la mammographie et une multicentricité des lésions
-2,5% des carcinomes lobulaire in situ possiblement milticentriqueavec une tendance à la bilatéralisation.

L'examen anatomo-pathologique permet également de donner le grade histo-pronostique de Scarff Bloom Richardson (SBR) de la tumeur (établi selon des critères architecturaux, les atypies cyto-nucléaires et le nombre de mitoses observés) et d'évaluer l'invasion vasculaire et lymphatique (118) (figure 14).

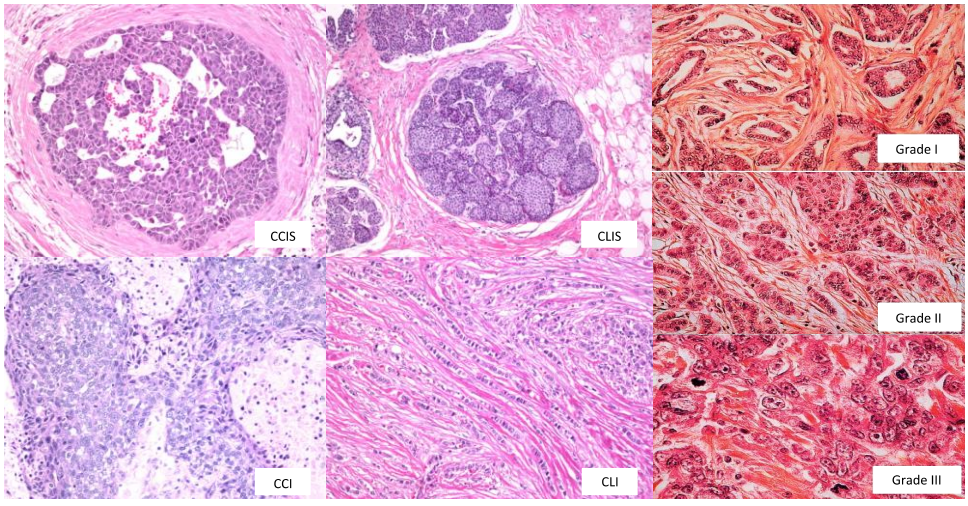


Figure 14 :
Coupes histologiques des principaux types tumoraux et grades histo-pronostiques de SBR (CCIS : carcinome canalaire in situ ; CCI : carcinome canalaire infiltrant ; CLIS : carcinome lobulaire in situ ;CLI : carcinome lobulaire infiltrant) (images du Collège Français des Pathologistes).

c. Classification moléculaire

En 2000, des analyses du transcriptome des tumeurs mammaires à haut débit ont identifié des profils moléculaires basés sur l'expression des gènes ER, PR, HER2 associé à un marqueur de prolifération Ki67 (119). L'utilisation clinique de cette caractérisation moléculaire établie en anatomopathologie par immunohistochimie (voire hybridation in situ pour HER2) est recommandée par la société européenne d'oncologie médicale (ESMO) et la St Gallen consensus conference (95,120). Les cancers du sein se répartissent en 4 groupes principaux: luminal A et B, HER2 et basal-like (figure 15).

- Le profil luminal est défini par

- une forte réceptivité aux hormones corrélée à l'expression de récepteurs aux oestrogènes ERα associée ou non à celle des récepteurs à la progestérone (PR)
- une expression élevée de gènes de la différenciation luminale (cytokératines 8,18 et 19) et de gènes impliqués dans le développement et la différenciation des tumeurs ER+.

2 sous types luminaux se distinguent :
- le sous-type A (50 à 60 % des tumeurs mammaires) n'exprimant pas HER2
- le sous-type B (10-20% des tumeurs mammaires) marqué par une plus forte capacité de prolifération malgré une plus faible expression du ERα (comprenant 2 sous classes selon la présence et le niveau d'expression d'HER2, Ki67 et PR).

- Le profil HER2 (10 à 15% des tumeurs mammaires) est caractérisé par une amplification du gène HER2 codant pour un récepteur de l'EGFR (facteur de croissance épidermique) pro-proliférant. Ki67 y est fortement exprimé, de même que les cytokératines 5/6, 17 et 14, marqueurs de cellules basales. L'expression des récepteurs hormonaux est possible mais à faible niveau rendant ces tumeurs peu sensibles aux hormones.

- Le profil «basal-like» n'exprime aucun marqueur ER PR ou HER2 et caractérise des tumeurs aggressives et invasives. Elles correspondent à 80% des tumeurs dites triple négatives. Elles expriment les marqueurs de cellules épithéliales basales (cytokératines 5/6,17 et 14).

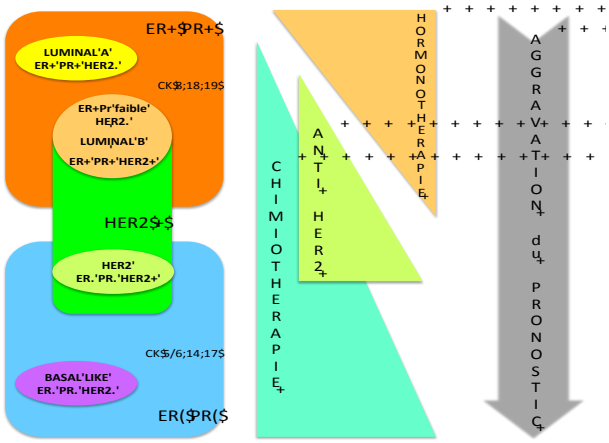


Figure 15 : Types moléculaires du cancer du sein, réponse attendue aux traitements et pronostic

d. Particularités des cancers de la femme jeune

Les femmes de moins de 40 ans présentent une prévalence plus élevée de tumeurs triple négatives et HER2+(121).

A l'institut européen de cancérologie de Milan entre 1997 et 2000, les cas enregistrées de cancers du sein ont permis de comparer 185 patientes âgées de moins de 35 ans à 1427 âgées de 35 à 50 ans (122): au diagnostic les femmes jeunes présentent plus fréquemment des tumeurs ER-, une forte expression de Ki 67, une invasion vasculaire ou lymphatique ainsi que un grade SBR 3 sans qu'aucune différence statistiquement significative n'ait été relevée pour le stade TNM.

Chez la femme de moins de 40 ans, les sous types luminaux A et B sont différents avec une expression plus faible des récepteurs hormonaux. Le sous type luminal B et les tumeurs triple négatives sont plus fréquemment de haut grade avec une expression plus forte de Ki67 (123).

2. Stratégies thérapeutiques : synthèse des recommandations et conférences de consensus

De nombreuses recommandations et conférences de consensus émanant de différentes sociétés de cancérologie encadrent les possibilités de traitement du cancer du sein (89,95,120). Chaque patiente se voit proposer une stratégie thérapeutique décidée en réunion de concertation pluridiciplinaire dans des centres de référence en oncologie. Le but de ces RCP est d'évaluer l'aggressivité de la tumeur et le risque de récidive. Elle se base sur des facteurs pronostiques reconnus : expression ER/PR, HER2, marqueurs de prolifération, nombre de ganglions atteints, histologie, taille tumorale et invasion vasculaire péritumorale. Cette stratégie thérapeutique se veut adaptée aux particularités de la patiente (stade et type tumoral, antécédents, comorbidités, choix personnels de la patiente…). L'âge en lui-même n'est pas un facteur déterminant du choix thérapeutique. La stratégie fait appel à différents moyens : chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, hormonothérapie et thérapies ciblées.

a. Chirurgie

Circonstance curative

L'exérèse chirurgicale de la tumeur primaire est réalisée dans la plupart des cas. La tumorectomie ou chirurgie conservatrice constitue le traitement principal des carcinomes in situ et des tumeurs de petite taille (<3cm). Elle concerne 60 à 80 % des cancers du sein en Europe. Une attention particulière est portée aux limites d'exérèse (marges de sécurité de 2 mm) pour adapter la stratégie thérapeutique.

Pour les carcinomes de grande taille ou infiltrant voire métastatiques, une mastectomie est réalisée. La reconstruction mammaire (immédiate ou secondaire) est systématiquement proposée si le schéma thérapeutique le permet. En peropératoire, la technique du ganglion sentinelle est réalisée pour juger de l'intérêt du curage axillaire. Les carcinomes in situ de petite taille, unifocaux et de bas grade peuvent en être exemptés dans certains cas. Le curage axillaire est réalisé en cas de macrométastases du ganglion sentinelle. Dans certains cas on peut surseoir au curage en cas de présence de cellules tumorales isolées ou de micrométastases entre 0,2 à 2 mm

Circonstance préventive

En cas de mutation des gènes BRCA1 ou 2, le risque de cancer du sein est de 80 à 85%. La mastectomie prophylactique bilatérale diminue l'incidence du cancer du sein et surtout diminue la mortalité de 90-95%.

b. Radiothérapie

La radiothérapie du cancer du sein consiste en une irradiation du sein entier avec une dose totale de 40-50 Gy en 25 à 28 fractions de 1,8 à 2 gray éventuellement complétée d'un boost de 10 à 16 Gy. L'hypofractionnement ou l'irradiation partielle du sein ne sont pas recommandés chez les femmes jeunes.

La radiothérapie est indiquée pour tous les cancers infiltrants et ceci d'autant plus qu'une chirurgie conservatrice a été réalisée. Le jeune âge de la patiente fait partie des critères d'indication du boost complémentaire. Le boost est également conseillé en cas de grade 3, d'invasion vasculaire ou de limites d'exérèse non satisfaisantes. La radiothérapie est également indiquée en cas de mastectomie, systématique en cas de tumeur T3 ou T4 ou N supérieur ou égal 4, en cas de limites d'exérèse insuffisantes, à envisager chez les patientes jeunes, en cas d'invasion vasculaire ou si peu de ganglion ont été examinés.

Pour les carcinomes non invasifs, les indications sont moins consensuelles. A priori un carcinome canalaire in situ (CCIS) de moins de 10 mm de faible grade traité par chirurgie conservatrice avec des marges d'éxèrèse suffisantes peut ne pas être traité par radiothérapie. Il en est de même pour un CCIS traité par mastectomie avec marges saines.

c. Chimiothérapie

La chimiothérapie par principe systémique a pour but de limiter la propagation des cellules cancereuses dans l'organisme. Elle concerne la plupart des patientes sauf certains carcinomes in situ avec limites d'éxèrèse saines. Son administration peut suivre la chirurgie (2 à 6 semaines en général : on parle de chimiothérapie adjuvante) ou la précéder. En situation néoadjuvante, on attend au mieux une réduction du volume tumoral autorisant une chirurgie conservatrice.

Pour le choix de la chimiothérapie adjuvante, le type moléculaire de la tumeur (statut des ER, PR) et les marqueurs de prolifération sont déterminants. Les tumeurs bien différentiées de type luminal A peuvent n'être traitées que par hormonothérapie (sauf >N4,>T4 ou grade 3). En cas de type luminal B, les tumeurs HER2+ répondent mieux à la chimiothérapie que les tumeurs HER2-. Les tumeurs non luminales (HER2+ et basal-like) sont celles pour lesquelles le bénéfice attendu de la chimiothérapie est le plus important. Les tumeurs ER- sont les plus sensibles à la chimiothérapie. L'effet sur les tumeurs ER+ est au moins en partie expliqué par l'insuffisance ovarienne induite par la chimiothérapie (figure 15).

Aujourd'hui des tests génomiques existent et peuvent aider au choix de la chimiothérapie sans que leur utilisation soit consensuelle (mamaprint® ou oncology DX® pour l'estimation du risque de récurrence ; adjuvant online predict® ou Nottingham prognostic index).

Différentes drogues peuvent être utilisées dans des schémas combinés ou séquentiels :

- inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques : le 5 fluoro-uracile (F : antimétabolite) ou le méthotrexate (M)

- agents intercalant de l'ADN : les antracyclines (A : adriamycine/doxorubicine et E : épirubicine)

- alkylants : cyclophosphamide (C)

- poison du fuseau mitotique : les taxanes (docétaxel TAXOTERE® et paclitaxel TAXOL®)

Les protocoles de chimiothérapie proposés aux patientes sont très nombreux, les plus courants sont de type FEC auxquels peuvent être ajoutés des taxanes.

Le protocole FEC 100 suivi de trois cures de taxanes correspond à un schéma de première ligne avec 3 cures de 5 fluorouracile (500 mg/m2), épirubicine (100mg/m^2), et cyclophospamide (500 mg/m^2) suivi de 3 cures de taxanes (docétaxel (100 mg/m^2) en première intention), chaque cure étant espacées de 21 jours en général. Ce protocole est fréquement proposé, notamment en cas d'atteinte ganglionnaire quelque soit le statut des récepteurs hormonaux. Il est aussi une alternative au 6 FEC en l'absence d'atteinte ganglionnaire et en présence de facteur de risque et est également proposé aux tumeurs HER2+. Les autres protocoles les plus courants sont : 6FEC; 4AC suivi ou non de taxanes; 6 TAC ou encore 6 CMF.

Les essais cliniques ont prouvé que six cycles de trois drogues comprenant une anthracycline ont une efficacité supérieure aux anciens schémas CMF ou 4 cycles AC. L'ajout de taxanes (non concommitant aux anthracyclines du fait de la cardiotoxicité) augmente l'efficacité de la chimiothérapie et a permis de diminuer la mortalité d'un tiers. L'intensification des régimes habituels en terme de dose est indiquée pour les tumeurs très proliférantes. Même si la tolérance est meilleure chez les femmes jeunes, l'âge isolé ne justifie pas l'intensification de la chimiothérapie. Au total 4 à 8 cycles seront réalisés en fonction du risque de rechute et ou du régime choisi (12 à 24 semaines).

La chimiothérapie du cancer du sein détruit les cellules cancéreuses dans le but d'éviter les récidives locales ou à distance, de réduire le volume tumoral (en cas de tumeur inopérable) et celui des métastases au prix de toxicité propre à certaines molécules (cardiaques pour les anthracyclines) ou partagée (alopécie, nausées vomissement cytopénies…).

La réserve folliculaire ovarienne, non renouvelable est touchée. Si cette ovotoxicité est redoutée en terme de préservation de la fertilité, elle participe pour les tumeurs exprimant les récepteurs aux oestrogènes à l'effet antitumoral en supprimant la production de stéroïdes ovariens.

d. Hormonothérapie

L'hormonothérapie concerne les tumeurs mammaires exprimant les récepteurs aux oestrogènes (exprimée dans au moins 1% des cellules cancéreuses), c'est à dire principalement les tumeurs de type luminal avec un meilleur taux de réponse en cas d'expression conjointe des récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone. Deux stratégies existent : supprimer la production des hormones ou empêcher leur action via leurs récepteurs tumoraux.

La suppression hormonale n'est pas envisageable en première intention chez la femme non ménopausée. La synthèse ovarienne des oestrogènes peut être inhibée en bloquant la synthèse des gonadotrophines hypophysaires par des analogues de la GnRH ou en inhibant l'aromatase (anastrozole, létrozole ou éxémestane). Les inhibiteurs de l'aromatase sont aujourd'hui les molécules de choix pour l'hormonothérapie des femmes ménopausées. La justification de ce traitement repose sur le fait qu'il augmente le temps de survie sans récidive sans modifier la survie globale.

En pré-ménopause, le choix de l'hormonothérapie doit se porter sur les anti-oestrogènes, agissant par compétition avec les récepteurs mammaires aux oestrogènes sans bloquer la synthèse endogène ovarienne (et donc ses effets sur les autres organes). Deux types d'anti-oestrogènes existent : les SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) principalement utilisés et les SERD (Selective Estrogen Receptor degradation)

Les SERM dont le chef de file est le tamoxifène agissent par compétition avec les oestrogènes sur les récepteurs mammaires. Ils ont une activité agoniste partielle selon le tissu et la concentration. De nombreuses études ont démontré son efficacité chez la femme préménopausée : le Tamoxifène réduit de 25% le risque de récidive. Il est administré à la dose de 20 mg/jour pendant 2 à 5 ans en général. Cependant le Tamoxifène augmente le risque thromboembolique et le risque de cancer de l'endomètre par hyperplasie endométriale.

e. Autres thérapies

D'autres thérapies ciblant la prolifération tumorale ont été développées et sont couramment utilisées en fonction de l'expression tumorale des récepteurs impliqués.

Le Trastuzumab cible le recepteur HER2, exprimé dans environ 25% des tumeurs, dont la voie de signalisation favorise la prolifération cellulaire. Son utilisation combinée aux taxanes de la chimiothérapie (jamais avec les anthracyclines à cause du risque de cardiotoxicité cumulée) diminue de moitié le risque de récidive. Il est indiqué pour toute tumeur HER2+ supérieure à 1cm quelque soit le statut ganglionnaire. Son indication se discute même si la tumeur est de petite taille surtout si considérée à haut risque. Il est poursuivi après la chimiothérapie pour une durée totale de un an en général.

En dehors d'éventuels protocoles, il n'existe pas à ce jour de traitement ciblé contre les tumeurs triple négative.

f. Suivi

Le suivi de la patiente est centré sur la détection de la récidive et ou de la survenue d'un cancer controlatéral. La survie à 10 ans en Europe est supérieure à 70% (89% si localisé 60% si régionalisé). Le pic de récidive est observé dans la deuxième année après le diagnostic. Le risque de récidive global est supérieur pour les tumeurs avec envahissement ganglionnaire. Le taux de récidive dans les premières années pour les tumeurs ER- est supérieur aux tumeurs ER+. Des rechutes tardives sont observées même à plus de 20 ans du diagnostic et sont plus fréquentes en cas de tumeurs ER+. La survie sans récidive des patientes est également différente en fonction du sous type moléculaire identifié au diagnostic : les plus longues sont observées pour les sous types luminaux A, les plus courtes pour les HER2 et triple négatif (figure 15) (124).

Le jeune âge est un facteur de risque de récidive locale et à distance et de cancer controlatéral. La mortalité dans cette classe d'âge est également plus élevé.

S'ajoutant à la traque de la récidive, l'évaluation de la qualité de vie est aujourd'hui un enjeu important du suivi : la fonction ovarienne et la fertilité post thérapeutique en sont des déterminants essentiels.

L’évolution de l’incidence et de la survie des femmes jeunes traitées pour cancer du sein laisse envisager une demande croissante de prise en charge de la fertilité par notre système de soins. Si la rémission est admise comme prioritaire, les conséquences des traitements sur la fertilité sont au coeur des préoccupations des femmes jeunes atteintes de cancer du sein(125).

En 2013, une étude européenne EORTC a décrit le comportement de 400 femmes atteintes de moins de 35 ans. Dès le diagnostic, 59% des femmes avaient encore des projets de grossesse, 36% acceptaient de renoncer à une éventuelle grossesse par crainte de récidive tumorale, 8% refuseraient une chimiothérapie décrite comme réduisant leur fertilité. Néanmoins, 48 % de ces femmes se déclaraient prêtes à accepter un risque élevé d’infertilité supérieur à 75% (décision plus fréquente chez les femmes ayant déjà eu un ou des enfants) (126).

Pour être en mesure de proposer une prise en charge adaptée, l’impact de la chimiothérapie et de l’hormonothérapie sur la réserve ovarienne doit être étudié sans oublier l’utilité de son effet suppresseur de la fonction ovarienne comme agent anti tumoral sur un cancer hormono dépendant.

V. TOXICITE OVARIENNE DES CHIMIOTHERAPIES UTILISEES DANS LE CANCER DU SEIN

1. Cytotoxicité et ovaire

Différentes classes d'agents cytotoxiques sont utilisées dans le traitement du cancer du sein empêchant la division de la cellule tumorale :

- les alkylants, les antibiotiques cytotoxiques et les anti métabolites à l'origine des lésions de l'ADN
- les agents tubulo affines, poisons du fuseau mitotique.

La cytotoxicité des agents cytotoxiques est par définition d'autant plus forte que la cellule touchée prolifère rapidement sans étape de différenciation, caractéristique commune aux cellules tumorales. Cependant l'action de ces molécules est systémique sans spécificité pour les tissus cancéreux. Les tissus sains notamment à fort index mitotique sont touchés, à l'origine des effets indésirables connus de la chimiothérapie : myélosuppression, alopécie, troubles de la cicatrisation, atteinte des muqueuses digestives... La réversibité de ces troubles dépendra des capacités de régénération propres à chaque type cellulaire.

Les conséquences sur le tissu ovarien sont décrites comme pouvant donner théoriquement une stérilité par déplétion complète du stock folliculaire par définition non renouvelable. L'ovaire est constituée des follicules primordiaux et de follicules en croissance : les primordiaux, quiescents et donc sans activité mitotique seraient protégés. Le développement des follicules une fois activés se fait aux dépens de la prolifération des cellules de la granulosa et de la croissance de la taille de l'ovocyte. La variabilité des taux de prolifération des cellules de la granulosa au cours de la croissance antrale laisse supposer une sensibilité variable des différentes classes de follicules en croissance aux agents cytotoxiques. L'évaluation de la toxicité folliculaire doit en tenir compte. Si l'étude de la toxicité ovarienne des chimiothérapies se conçoit facilement en ne considérant qu'une molécule, la détermination ou prévision des conséquences in vivo sur la réserve ovarienne de la femme se complexifie du fait de l'usage combiné et séquentiel des schémas thérapeutiques proposés au patientes (127).

Les mécanismes mis en jeu dans la mort cellulaire observée dans l'ovaire pendant le traitement par chimiothérapie reposent principalement sur l'activation des voies pro-apoptotiques comme dans l'atrésie physiologique (128)(129).

2. Les effets ovariens selon les molécules utilisées

La capacité propre de chaque type d'agent cytotoxique à agir à tout moment du cycle cellulaire ou uniquement pendant certaines phases, explique pour beaucoup la gradation des lésions ovariennes observées.

Les alkylants au mécanisme d'action indépendant de la phase du cycle cellulaire font partie des agents de chimiothérapie reconnus comme les plus ovotoxiques, car théoriquement capables de toucher à la fois les follicules quiescents et en croissance (130). Les 5 FU et anthracyclines sont préférentiellement actives en phase S. Les taxanes sont eux actifs en phase de mitose.

a. L'atteinte folliculaire directe

Cyclophosphamide

Le cyclophosphamide de la famille des alkylants est métabolisé par les cytochromes P450 hépatiques en moutarde phosphoramidée, capable de former des liaisons covalentes avec les nucléotides de l'ADN. Par ses propriétés bi-alkylantes, la moutarde phosphoramidée crée des ponts intra et inter-caténaires perturbant la réplication de l'ADN en phase S du cycle cellulaire. Toutefois, l'alkylation peut à tout moment du cycle cellulaire directement déstabiliser les bases de l'ADN à l'origine de dépurination ou d'ouverture du cycle de la base ou bien créer secondairement des lésions de l'ADN à type de cassure suite aux mécanismes de réparation mis en jeu par la cellule. De plus, il est potentiellement à l'origine de mutations ponctuelles (erreurs de réplication ou de réparation de base). Des altérations majeures de la structure des chromosomes (fragmentation, déletion) en résultent conduisant le plus souvent à la mort de la cellule ciblée (131).

Dans l'ovaire, les mécanismes lésionnels cellulaires sous cyclophosphamide sont similaires à ceux observés dans toute cellule : en culture sont constatées des cassures double brin de l'ADN (132,133). Chez la rat , le poids de l'ovaire diminue, toutes les classes folliculaires sont atteintes des primordiaux aux follicules antraux tardifs, bien que la déplétion prédomine sur les follicules activés du stade secondaire à antral (130). Chez les rongeurs, une diminution significative des follicules primordiaux corrélée à la dose d'alkylant est objectivée (134). L'implication de l'apoptose comme mécanisme de mort cellulaire consécutive à l'administration de métabolites actifs du cyclophosphamide est démontrée dans les cellules de la granulosa de rat.

En présence de moutarde phosphoramidée, les follicules primordiaux en culture présentent de nombreuses cassures double brin. Toutefois, l'inhibition des caspases dans ces follicules primordiaux d'ovaires en culture ne modifie pas la perte de follicules primordiaux observée similaire au groupe contrôle sans inhibition des caspases.(133) La déplétion en follicules primordiaux pourrait être liée à un autre mécanisme que l'apoptose.

D'autre part, des expériences sur des cellules de granulosa humaines suggèrent que les lésions de l'ADN constatées sous cyclophosphamide et l'apoptose qui s'ensuit ne seraient pas uniquement consécutives à l'alkylation directe des bases de l'ADN. En effet, une augmentation des concentrations en espèces réactives de l'oxygène et un diminution de la concentration de Gluthation réduit (impliqué dans la détoxification de ces dernières) sont constatés Ces modifications sont corrélées à la dose d'alkylant administrée (135) : le stress oxydatif serait donc impliqué dans la cytotoxicité ovarienne du cyclophosphamide.

Chez la femme, les effets directs du cyclophosphamide sur les follicules ovariens sont éthiquement difficiles à étudier. Une autre approche a été tentée par xenogreffe de fragments d'ovaires fœtaux humains transplantés chez des souris immunodéficientes de type SCID. Ces ovaires soumis au cyclophosphamide ont présenté une diminution significative de leur réserve (136).

Anthracyclines

Doxorubicine et épirubicine sont des anthracyclines : antibiotiques cytotoxiques d'origine microbienne. L'épirubicine a été développée secondairement et présente l'avantage d'une moindre cardiotoxicité.

Ces agents intercalants sont actifs essentiellement pendant la phase S mais aussi à tout moment du cycle cellulaire. Leur présence entre deux bases adjacentes d'un brin d'ADN modifie la configuration spatiale de la molécule d'ADN créant des interférences avec la réplication en empêchant la progression de l'ADN polymérase. En dehors de la phase S, en position intercalée elles inhibent la transcription. En position non intercalées elles stabilisent les complexes topo isomérase II /ADN coupé en inhibant l'activité ligase de l'enzyme. De plus, la structure cyclique des anthracyclines constitue une quinone acceptrice d'électron formant des semi-quinones liposolubles dans les membranes cellulaires dont la réduction est à l'origine d'une production de radicaux libres de l'oxygène.
Les cassures double brin de l'ADN ainsi que les lésions moléculaires induites par les RLO déclenchent l'apoptose.

L'ovotoxicité des anthracyclines repose largement sur les études portant sur la doxorubicine. Dans l'ovaire comme dans les autres organes, les cellules exposées présentent des signes d'apoptose et d'arrêt du cycle cellulaire.(137).

- In vitro :

Dans des cultures d'ovaires néonatales de souris traitées par des doses de doxorubicine à des niveaux de concentrations retrouvés en oncologie humaine, des lésions de la granulosa des follicules en croissance antrale dès le stade primaire mais également des ovocytes sont attestées par des marqueurs d'apoptose (138,139).

Le stress oxydatif observées après exposition directe in vitro d'ovocyte joue également un rôle dans la perte folliculaire sous doxorubicine (140).

- In vivo :

Dans l'ovaire murin, des phénomènes d'atrésie et d'apoptose sont mis en évidence dans les heures suivant l'administration de doxorubicine (141). 1 mois après traitement, la taille ovarienne de souris traitées par la doxorubicine est réduite de moitié de même que le nombre d'ovocytes ovulés (142).

En 2012, l'étude de Roti apporte un élément nouveau : in vivo chez la souris, la doxorubicine s'accumule dans un premier temps dans la médullaire puis diffuse vers corticale et la périphérie suivant le trajet vasculaire et la perfusion connue de l'ovaire. Cette étude démontre l'atteinte du stroma : les premières lésions de l'ADN sont en effet objectivées dans les cellules du stroma ovarien puis dans les cellules de la granulosa et enfin dans les ovocytes. Quantitativement les lésions de l'ADN sont plus nombreuses dans les cellules de la granulosa. Les signes indirects d'apoptose dans la granulosa précèdent dans le temps ceux des ovocytes. En terme de classes folliculaires atteintes, les follicules en croissance antrale subissent l'apoptose quoique les follicules primordiaux et primaires ne soient pas exempts, à distance de lésoins double brin de l'ADN (143).

- Chez la femme, Soleimani et al confirme par xénogreffe chez la souris les mécanismes observés dans les modèles murins : cassures double brin de l'ADN, apoptose et lésion du stroma avec altération de la vascularisation ovarienne (144).

Le 5 FU : anti métabolite

Les anti-métabolites agissent sur les voies de synthèse de l'ADN et ou de l'ARN. Le 5 FU, analogue de base pyrimidique contient un atome de fluor sur le carbone 5 lui permettant de perturber la synthèse des bases pyrimidiques. Habituellement l'uracil naturel est transformé en thymidine par la thymidilate synthétase par ajout d'un groupe méthyl sur le 5ème carbone de la base.

Le 5 FU présente deux mécanismes d'action :
-l'inhibition via l'atome de fluor de la thymidilate synthetase par le 5 fluorodeoxyuridine monophosphate et la FUTP (fluorouridine triphosphate) produits du métabolisme du 5 fluoro-uracile. La synthèse de l'ADN est altérée par défaut quantitatif de thymidine.
-l'incorporation directe de dUTP ou FdUTP dans l'ADN et/ ou l'ARN (pour le FUTP) occasionnant des erreurs dans la réplication et la transcription de l'ADN mais aussi dans la traduction de tous les types d'ARN à l'origine entre autres de protéines non fonctionnelles.
Le 5FU agit donc préférentiellement en phase S du cycle cellulaire et est donc plutôt considéré comme spécifique de cette phase.

Peu de données existe sur la toxicité ovarienne du 5 fluoro-uracil : compte-tenu de sa courte demie-vie, une étude chez la souris a été menée par Hrushesky en 1999 pour évaluer les effets ovariens du traitement par 5 fluoro-uracile en fonction du moment d'administration du traitement pendant le cycle menstruel. Se basant sur le taux de grossesse obtenue après traitement, il constate une diminution de la fertilité uniquement en cas d'administration dans la phase post ovulatoire immédiate (145).

Taxanes : poisons du fuseau mitotique

Les taxanes sont des agents tubulo affines. Leur liaison à la tubuline inhibe la dépolymérisation des microtubules. Ils suppriment leur instabilité dynamique à l'origine d'un arrêt mitotique en métaphase initiant l'apoptose de la cellule ciblée. Deux molécules présentant une pharmacologie différente sont utilisées dans le traitement du cancer du sein : le doxétaxel et le paclitaxel. L'affinité du doxétaxel pour la sous-unité beta de la tubuline est deux fois supérieure à celle du paclitaxel. La concentration de doxétaxel nécessaire à l'obtention de la dépolymérisation maximale des MT est ainsi 2 fois inférieure à celle du paclitaxel. Ils agissent tous deux en phase G2 et M mais l'intéraction du docétaxel avec l'organisation du centrosome confère à ce dernier une action supplémentaire en phase S (146).

La toxicité ovarienne des taxanes a été étudiée pour le paclitaxel une des molécules les plus utilisées. Que ce soit chez le rat ou la souris, les résultats des études s'accordent sur une atteinte des follicules en croissance antrale.
En plus de l'atteinte cytotoxique, la dérégulation des microtubules dans les cellules de la granulosa des follicules inhibe transitoirement la stéroïdogénèse, phénomène réversible pouvant expliquer en partie l'aménorrhée constatée sous traitement (147).

Chez le rat, Tarumi constate une diminution des follicules antraux ainsi qu'une augmentation de l'atrésie de cette classe folliculaire après administration de 5 doses de paclitaxel à trois jours d'intervalle. Dans cette étude, l'apoptose n'est détectable que dans ces follicules (148).

L'atteinte de la réserve folliculaire primordiale est ainsi plus controversée. Si dans l'étude de Tarumi le nombre de follicules primordiaux est stable, les résultats de trois autres publications toujours chez les rongeurs sont en faveur d'une toxicité dirigée contre les primordiaux : à la dose de 7,5 mg/kg le paclitaxel est à l'origine d'une diminution de la population folliculaire primordiale, dont l'importance est corrélée à la dose (149–151).

b. Atteinte du stroma et de la vascularisation ovarienne

La corticale ovarienne riche en follicules primordiaux est faiblement vascularisée contrairement à la médullaire. Les ovaires de jeunes filles traitées par chimiothérapie pour leucémie présentent des signes échographiques de fibrose du stroma ovarien associés à des modifications de la vascularisation capillaire (152). En 2007, l'équipe de Meirow confirme les lésions chimio-induites du cortex ovarien et de sa vascularistion (153). Un amincissement avec hyalinisation des vaisseaux corticaux, néovascularisation (petits capillaires immatures et désorganisés) et fibrose corticale focale sous capsulaire sont constatés. Ces lésions sont observées sous cyclophosphamide et doxorubicine (144).

En 2012, chez 20 patientes en âge de procréer traitées par chimiothérapie pour cancer du sein, une corrélation entre les lésions vasculaires, l'altération de la perfusion ovarienne, la diminution du volume ovarien et les concentrations hormonales anormales avec signes cliniques d'insuffisance ovarienne a été démontrée (154).

Au total, les lésions ovariennes chimio-induites comprennent une diminution de la réserve folliculaire par apoptose ou atrésie prématurée et des lésions vasculaires aboutissant à une fibrose corticale voire à une atrophie ovarienne. Les effets de la chimiothérapie s'apparentent donc à une accélération du vieillissement ovarien (155).

OBJECTIFS

L'objectif principal de l'étude est de décrire l'évolution des concentrations sériques d'AMH, marqueur de réserve ovarienne, chez des patientes jeunes en âge de procréer au décours de la prise en charge d'un cancer du sein traité par chimiothérapie adjuvante ou néoadjuvante. La population étudiée est issue de la cohorte constituée à l'occasion de l'étude RESOVA, PHRC national Cancer de 2009 pour laquelle le Professeur Paul Barrière est l'investigateur coordonateur. Cette étude prospective multicentrique est strictement observationnelle. Les patientes ont été sélectionnées sur le critère du protocole de chimiothérapie : le standart de type 3 FEC + 3 à 4 Taxotère®.

Pour cela, nous avons :

- décrit les concentrations d'AMH mesurées chez ces femmes au diagnostic,

- décrit les variations des concentrations d'AMH entre chaque cure de chimiothérapie en fonction de l'âge et de la concentration initiale,

- déterminé le moment d'indétectabilité de l'AMH en fonction de l'âge et de la concentration d'AMH initiale,

- comparé la cinétique de décroissance en fonction de l'âge, de la concentration d'AMH initiale et de la persistance d'un épisode de menstruations rapporté par les patientes lors de la dernière cure de chimiothérapie.

MATERIELS ET METHODES

I. Design de l'étude

Le schéma de l'étude RESOVA a été élaboré en tenant compte à la fois de l'incidence du cancer du sein de cette catégorie d'âge publiée dans la littérature et des concentrations sériques moyennes d'AMH mesurées chez ces mêmes femmes en dehors de tout contexte oncologique. Un effectif de 250 patientes a été calculé pour répondre aux objectifs de l'étude RESOVA, nécessitant la participation pendant 2 ans de 11 centres de lutte contre le cancer français : Bordeaux, Caen, Clermont-Ferrand, Dijon, Lille, Lyon, Montpellier, Paris, Reims, Rennes et Nantes.

Les critères d'inclusion étaient les suivants :
-femme âgée de plus de 18 ans et de moins de 40 ans
-atteinte d'un cancer du sein traité par chimiothérapie adjuvante ou néoadjuvante
-ayant donné un consentement éclairé.

Les critères d'exclusion ont été :
-âge supérieur ou égal à 40 ans à la sélection
-absence de traitement de cancer du sein par chimiothérapie adjuvante ou néoadjuvante
-antécédent de néoplasie traitée par chimiothérapie
-présence de comorbidités ou d'antécédent en lien avec la fertilité (insuffisance ovarienne, stérilité…).

Le protocole de suivi RESOVA prévoyait 10 visites réparties sur 24 mois après le diagnostic avec :
-une visite d'inclusion (avant administration de toute chimiothérapie),
-une visite à chaque période inter-cure et
-3 visites de suivi post chimiothérapie à 6,12 et 18 mois après la dernière cure de chimiothérapie.

II. Déroulement de l'étude

250 patientes ont été incluses de janvier 2010 à juillet 2011.

A la première visite, une information claire a été donnée à chaque patiente sur les modalités et la finalité de l'étude afin de recueillir son consentement pour participer à la constitution de FERTICOLL, biocollection adossée à l'étude RESOVA.
Un carnet d'informations écrites spécifiques à RESOVA complétées de questions pour le recueil de données initiales et le suivi a été remis à chaque patiente.
A chaque visite, un prélèvement sanguin a été réalisé et les données collectées sur ces carnets ainsi que dans un cahier d'observation médicale.

A l'inclusion (P0), avant chaque cure de chimiothérapie (P1 à P6), à 6 mois (P7), 12 mois (P8) et 18 mois (P9) après la dernière cure, le prélèvement sur tube sec est centrifugé et congélé à -20°C avant transfert au laboratoire de biochimie du CHU de Nantes pour réalisation centralisée des dosages de l'AMH.

Les données cliniques reportées dans les carnets de suivi et dans l'exemplaire papier du cahier d'observation médicale ont permis de renseigner au fur et à mesure la base de données de l'étude accessible sur internet et sécurisée avec codes d'accès personnels : l'eCRF (https://www.dirc-hugo-online.org/csonline).

Le suivi de l'étude a été assuré par une équipe de la cellule promotion de la recherche clinique du CHU de Nantes encadrée par les coordonateurs scientifiques de l'étude.

Des données jugées essentielles ont été « monitorées » :
-critères d'inclusion et d'exclusion
-conformité des dates de visites et de prélèvement par rapport au calendrier théorique
-données reportées correspondant aux chimiothérapies, aux carnets patientes
-les résultats des dosages de l'AMH
-les bilans de fin d'étude.

Les derniers prélèvements ont été réceptionnés à Nantes en mai 2014, les derniers dosages réalisés en juin 2014. L'analyse médicale des données cliniques avec vérification de concordance et d'exhaustivité avant clôture de la base de données s'est faite en juin-juillet 2014.

III. Sélection de la population étudiée

A l'issue de ce travail, les patientes ayant bénéficié du protocole standard de chimiothérapie 3 FEC 100 + 3 à 4 Taxotère® se sont révéles majoritaires (n=165) permettant d'analyser la décroissance de l'AMH sérique au décours d'un traitement à cytotoxicité présumée égale.

Sur la base des doses d'antracycline et de taxane renseignées et confirmées en fin d'étude, les patientes ont toutes reçu 300mg/m2 d'épirubicine sur les 3 premiers cycles de chimiothérapie et 300 à 400 mg / m2 de Taxotère® sur les 3 à 4 derniers cycles.

2 sous groupes de patientes ont été exclues de l'analyse de la décroissance :
-les patientes présentant une concentration d'AMH inférieure à 0,42 ng/mL au diagnostic, suspectes d'insuffisance ovarienne précoce ne permettant pas d'étudier une décroissance sous chimiothérapie (n=6) ;
-les patientes présentant une concentration d'AMH supérieure à 7 ng/ml suspectes biologiquement de syndrome des ovaires polykystiques, à fonction ovarienne pathologique dès le diagnostic (n=25) (156).

L'analyse de décroissance a donc porté sur 134 patientes.

IV. Données évaluées

Les caractéristiques générales prises en compte pour l'analyse des patientes traitées par 3 FEC + 3 à 4 Taxotère® sont les suivantes :

-âge calculé par différence de la date de sélection et la date de naissance
-les antécédents familiaux de cancer du sein et de l'ovaire
-le résultat de la recherche de mutation des gènes BRCA1 et 2.

Les caractéristiques du diagnostic oncologique de ces patientes prises en compte pour la description sont:

-le type histologique du cancer du sein classé en 4 catégories :
    -adénocarcinome canalaire
    -adénocarcinome lobulaire
    -adénocarcinome mixte
    -autre type histologique de tumeur
-le degré d'infiltration
    -infiltrant
    -in situ
-le grade histo-pronostique
    -I
    -II/III
-le statut ganglionnaire
-le statut métastatique
-le statut de récepteurs hormonaux
-le statut des récepteurs HER2.

Les caractéristiques de la prise en charge thérapeutique du cancer du sein (hors chimiothérapie) sont :

-endocrinothérapie par Tamoxifène
-thérapie anti-HER2
-notion d'inclusion dans un essai thérapeutique.

Les caractéristiques des cycles menstruels au décours de la chimiothérapie sont basées sur la présence de menstruations rapportées par la patiente (dichotomie oui/non) à chaque visite.

V. Suivi biologique de l'AMH sérique, marqueur de réserve ovarienne

Les dosages des concentrations sériques d'AMH des différents prélèvements réalisés aux 10 visites successives ont été réalisés au moyen du kit ELISA Immunotech Beckman Coulter™ (Marseille, France).

Le tableau suivant rappelle les spécificités techniques de ce dosage. Chaque série de 40 dosages a été validée techniquement par 2 niveaux de contrôle interne.

domaine de mesure	0,14-21 ng/mL
calibrateur	AMH rh
limite de détection	0,14 ng/mL
1er point de calibration correspondant à la Sensibilité fonctionnelle	0,42 ng/mL
CV de répétabilité	12,3%
CV de reproductibilité	14,2%

Tableau 1 : Spécificités techniques du dosage de l'AMH (technique BC Immunotech™)

Les statistiques sur les valeurs absolues d'AMH ont été calculées avec la valeur 0,42 ng/mL (sensibilité fonctionnelle) pour tout résultat rendu <0,42 ng/mL.

A partir des valeurs absolues d'AMH à chaque visite ont été calculées, pour l'évaluation de la décroissance, les valeurs suivantes :

-pour chaque patiente, la concentration de base pré thérapeutique correspond à la moyenne arithmétique des concentrations des prélèvements P0P1

-cette concentration de base a été convertie en % : 100% correspondant à la concentration initiale d'AMH mesurable
(valeur absolue de la moyenne P0P1- 0,42)

-chaque valeur de concentration d'AMH dosée au cours du suivi a été transformée pour exprimer la concentration d'AMH mesurable résiduelle à chaque visite :
Px- 0,42

-la variation cumulée à chaque visite correspond à l'expression en % de la variation d'AMH mesurable rapportée à la concentration initiale mesurable :
delta P0Px = ((Px-0,42)*100)/(P0P1-0,42)

Ce calcul de la variation permet quelque soit la concentration initiale de décrire la décroissance telle qu'une valeur <0,42 ng/mL se traduit par une décroissance égale à un taux de -100%.

-la part de variation imputable à une cure ayant eu lieu entre deux visites successives correspond à
delta PxP(x+1)= delta P0P(x+1)-deltaP0Px

-la « concentration d'indétectabilité » a été considérée comme correspondant à 0,50 ng/mL. Dans les faibles valeurs du domaine de mesure, le CV de répétabilité des dosages est élevé de l'ordre de 20% : 0,50ng/mL correspond à notre concentration minimale rendue (0,42ng/mL) majorée de ces 20%.

-le moment d'indétectabilité, lorsqu'atteint entre 2 prélèvements, est déterminé en tenant compte des concentrations absolues en AMH de ces 2 prélevements.Une approche à 2 décimales en nombre de prélévement a alors été calculée pour exprimer le moment d'indétectabilité.

VI. Analyses statistiques

Pour l'exploitation des résultats, des tests statistiques ont été réalisés :

-comparaison des données quantitatives de 2 groupes par test de Mann-Whitney
-comparaison des données quantitatives de 3 groupes par test de Kruskall-Wallis suivi du post test de Dunn
-corrélation par test de Spaerman.

Les résultats ont été obtenus à partir du logiciel GraphPad Prism™ version 5.
Une valeur $p< 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

RESULTATS

I. Caractéristiques générales de la population étudiée

Le tableau 2 présente les caractéristiques générales de la population étudiée en terme d'âge, de diagnostic, de régime de chimiothérapie, d'antécédents familiaux et de statut des gènes BRCA 1/2.

a. Démographie

L'échantillon sélectionné au sein de la cohorte RESOVA comprend 165 patientes âgées de 24,77 ans à 39,96 ans. L'âge moyen de la population étudié est de 34,96 ans sans différence statistique significative avec celui observé dans la cohorte RESOVA. 59,39% de patientes sont âgées d'au moins 35 ans (Tableaux 2 A et B).

b. Diagnostic histologique, moléculaire et extension

92,70% des patientes présentent un adénocarcinome de type canalaire (n=153), les types lobulaires sont rares à 5,5% (n=9). L'infiltration histologique de la tumeur primitive concerne 98,8% des patientes (n=163). On observe également une majorité de grade II/III (92,70%).

L'extension ganglionnaire et métastatique ainsi que la caractérisation moléculaire des tumeurs (limitée aux récepteurs hormonaux et HER2) sont présentées dans le tableau 3.
51,5% ont au moins un ganglion envahi. La majorité des patientes (97%) sont non métastatiques. Les tumeurs de grade II à III, prédominantes (92,7%), se répartissent équitablement en N+ (n=78) et N- (n=75).

Tout stade confondu, sur le plan moléculaire, 58,18% des tumeurs sont classées RH+/HER2- (n=96). 15,15% expriment en plus HER2 (n=25). 16,97% des patientes présentent des tumeurs dites « triples négatives » (n=28). 9,7% expriment HER2 sans co-expression des récepteurs hormonaux (n=16). Les quelques tumeurs de stade I (n=12) expriment toutes les récepteurs hormonaux avec une patiente classée HER2+ (tableau3).

c. Antécédents familiaux et statut des gènes BRCA

45,45% des patientes ont connaissance d'un antécédent familial de cancer du sein (n=75). Les antécédents familiaux de l'ovaire sont beaucoup plus rares de l'ordre de 4,24%(n=7).
Des mutations des gènes BRCA1/2 ont été retrouvées chez 9,09% des patientes (n=8).

A

		COHORTE RESOVA (n=247)				
âge		moyenne	médiane	min	max	ET
		34,72	35,54	24,77	39,96	3,908
catégories d'âge	< 30 ans	14,57%		n=36		
	[30-35[ans	29,55%		n=73		
	[35-40[ans	55,88%		n=138		

B

		3FEC + 3/4 TAXOTERE (n= 165)				
âge		moyenne	médiane	min	max	ET
		34,96	35,72	24,77	39,96	4,009
catégories d'âge	< 30 ans	14,55%		n=24		
	[30-35[ans	26,06%		n=43		
	[35-40[ans	59,39%		n=98		
type histologique	ADK canalaire	92,70%		n=153		
	ADK lobulaire	5,50%		n=9		
	ADK mixte	1,20%		n=2		
	autre	0,60%		n=1		
degré d'infiltration	infiltrant	98,80%		n=163		
	in situ	1,20%		n=2		
grade	I	7,30%		n=12		
	II/III	92,70%		n=153		
régime de chimiothérapie	3 FEC + 3 TAX	93,90%		n=155		
	3 FEC + 4 TAX	6,10%		n=10		
ATCD familiaux de cancer du sein	oui	45,45%		n=75		
	non	50,91%		n=84		
	ne sait pas	3,64%		n=6		
ATCD familiaux de cancer de l'ovaire	oui	4,24%		n=7		
	non	86,06%		n=141		
	ne sait pas	9,70%		n=17		
mutation des gènes BRCA	BRCA1	4,85%		n=8		
	BRCA2	4,24%		n=7		

Tableau 2
A. Caractéristiques démographiques des patientes de la cohorte RESOVA
B. Caractéristiques démographiques, histologiques et génétiques des patientes sélectionnées

			RH-/HER2-	RH-/HER2+	RH+/HER2-	RH+/HER2+
grade I (n=12)	N- (n=5)	M- (n=5)	0	0	4	1
		M+ (n=0)	0	0	0	0
	N+ (n=7)	M- (n=7)	0	0	7	0
		M+ (n=0)	0	0	0	0
grade II/III (n=153)	N- (n=75)	M- (n=75)	18	9	39	9
		M+ (n=0)	0	0	0	0
	N+ (n=78)	M- (n=73)	10	7	42	14
		M+ (n=5)	0	0	4	1
TOTAL 3 FEC + 3/4 TAXOTERE n=			28	16	96	25
TOTAL 3 FEC + 3/4 TAXOTERE %			16,97	9,7	58,18	15,15

Tableau 3
Caractéristiques moléculaires des tumeurs des patientes traitées par 3 FEC + 3 à 4 Taxotère® en fonction du grade, de l'extension ganglionnaire et métastatique

d. Prise en charge thérapeutique

Le tableau n°4 présente les caractéristiques de la prise en charge par chimiothérapie et hormono-thérapie, 35% des patientes ayant été incluses dans un protocole d'essai thérapeutique.

73,9% des patientes sont traitées par chimiothérapie adjuvante (n=122). Les chimiothérapies néoadjuvantes concernent 26,1% des patientes (n=43) quasiment toutes de grade II/III (n=42) sans différence notable entre les statuts N+(n=21) ou N-(n=21). 6% des patientes ont bénéficié de 4 cures de taxanes (n=10) en situation néoadjuvante pour la plupart (n=9/10).

Après chimiothérapie, 95% des patientes exprimant les récepteurs hormonaux ont bénéficié d'une hormonothérapie, le choix de la molécule se portant exclusivement sur du Tamoxifène. Une thérapie par anticorps anti HER2+ a été administrée chez 90,2% des patientes HER2+ (majoritairement de grade II/III).

	Chimiothérapie		Endocrinothérapie; par;Tamoxifène	Tumeur;RH+	Thérapie;anti;HER2	Tumeur;HER2+	Inclusion;essai; thérapeutique
	néoadjuvante	adjuvante					
I;N0M0	1/5	4/5	3	4	0	1	0
n=5							
I;N+M0	0/7	7/7	7	7	0	0	4
n=7							
II/III;N0M0	21/75	54/75	43	48	16	18	22
n=75							
II/III;N+M0	21/73	52/73	56	56	20	21	31
n=73							
II/III;N+M+	0/5	5/5	5	5	1	1	1
n=5							
TOTAL;3FEC;+;3/4;TAXOTERE	43/165	122/165	114	120	37	41	58
n=165							
COHORTE;RESOVA	76/247	71/247	156	167	65	69	101
n=247							

Tableau 4 :
Caractéristiques de la prise en charge thérapeutique en fonction du grade, de l'extension ganglionnaire et métastatique et du statut des récepteurs hormonaux et HER2.

II. Analyse de la concentration d'AMH mesurée au diagnostic

a. Concentration d'AMH et âge de la cohorte RESOVA au diagnostic

Au diagnostic, les 165 patientes considérées présentent une concentration d'AMH moyenne de 4,23 ng /mL (IC 95% [3,40-5,05] ; médiane 2,86 ng/mL) (figure 16).

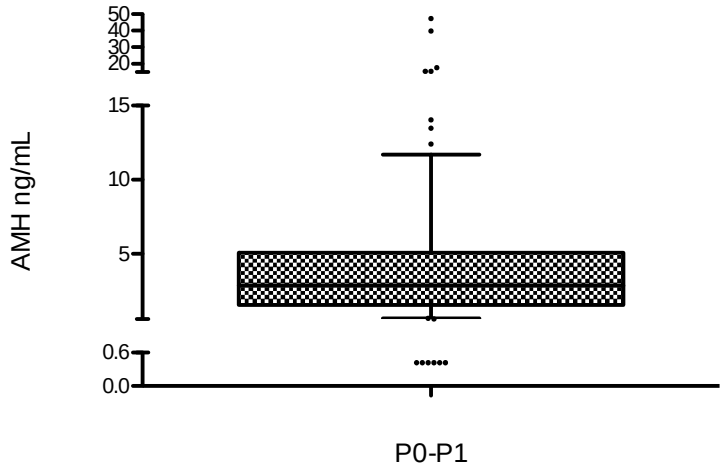
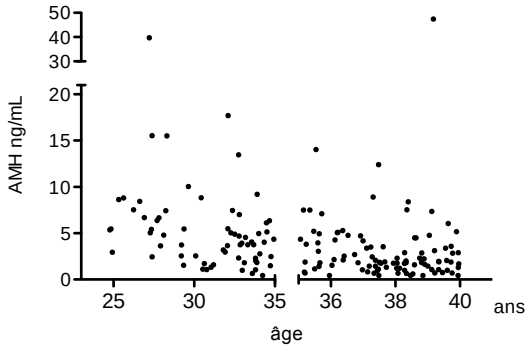


Figure 16 :
Concentration d'AMH au diagnostic des patientes traitées par 3 FEC + 3 à 4 Taxotère® (n=165)

Les résultats par classe d'âge sont présentés ci dessous :



Classe.d'âge.(années)		<30	[30%35[	[35%40[
effectif		n=24	n=43	n=98
âge	25e.P	26,35	32,09	36,40
	médiane	27,40	32,99	37,83
	75e.P	28,29	33,90	38,96
AMH. (ng/mL)	25e.P	4,00	1,82	1,23
	médiane	5,92	3,75	1,98
	75e.P	8,60	5,05	4,20

Figure 17 : Concentration d'AMH au diagnostic en fonction de l'âge (n=165)

Tableau 5 : Distribution de l'âge et de la concentration d'AMH au diagnostic par classe d'âge (n=165)

b. Sélection de la population étudiée

La population analysée en terme de décroissance correspond à 134 sélectionnées pour être dosables (>0,42 ng/mL) au diagnostic sans suspicion biologique de syndrome des ovaires polykystiques (AMH >7 ng/mL).

Exclusion des patientes non dosables

Au diagnostic, 6 patientes ont une concentration d'AMH non dosable par la technique utilisée (<0,42 ng/mL). Cet effectif représente 3,6% des patientes traitées par 3 FEC+ 3 à 4 Taxotère®. Elles sont âgées de 34,24 à 39,94 ans, Ces patientes resteront non dosables tout au long du suivi per chimiothérapie et déclareront toutes ne plus avoir de règles à l'issue immédiate de cette dernière, depuis 3 cycles consécutifs pour trois d'entre elles.

Exclusion des patientes à forte suspicion biologique de SOPK

25 autres patientes soit 15,2% de la population présentent à l'inverse une concentration initiale d'AMH compatible avec un syndrome des ovaires polykystiques soit un dosage supérieur ou égal à 7 ng/mL. La concentration moyenne d'AMH de ces patientes est de 12,55 ng/mL (médiane = 8,81 ng/mL ; Q1-Q3 [7,51 -13,75] avec 2 valeurs extrêmes à 39,70 et 47,50 ng/mL.

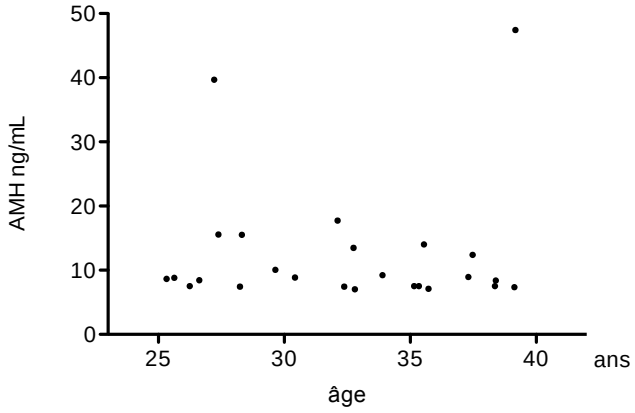


Figure 18 : Concentration d'AMH initiale des patientes suspectes de SOPK en fonction de l'âge (n=25)

c. Concentration d'AMH et âge de la population étudiée au diagnostic

La population sélectionnée de 134 patientes présente une concentration d'AMH initiale pré-thérapeutique moyenne de 2,84 ng/mL (IC 95% [2,57 ; 3,12] ; ET=1,64 ng/mL).

L'âge moyen de ces patientes est de 35,33 ans (IC 95% [34,68 ; 35,97] ; médiane= 36,21 ans ; ET=3,76 ans).

Le test de Spaerman montre une corrélation modeste mais significative entre l'AMH et l'âge au diagnostic ($p<0,05$; $r = -0,36$) (Figure 19A).

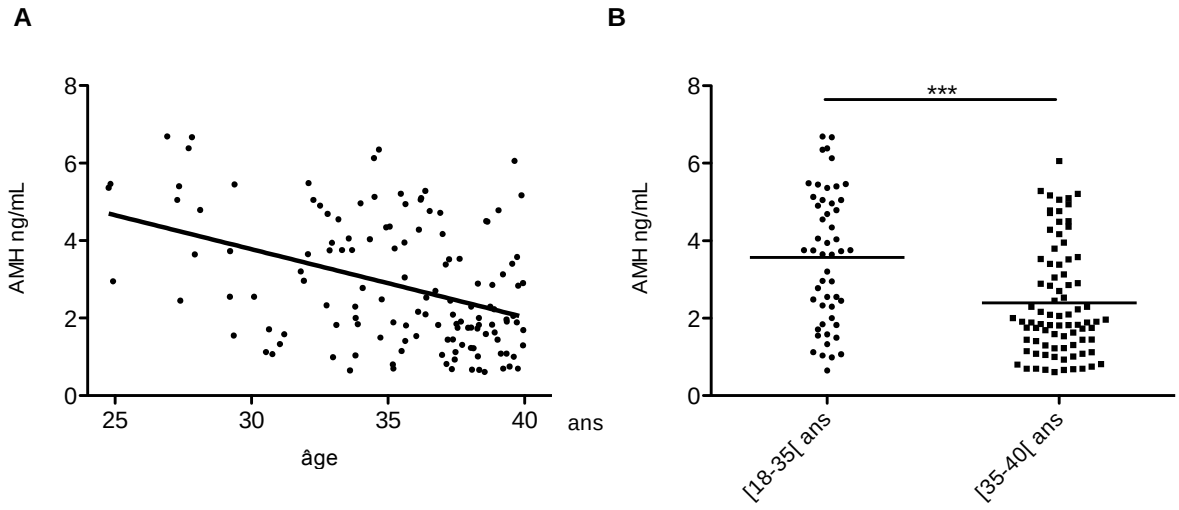


Figure 19 :
A. Concentration d'AMH au diagnostic (P0-P1) en fonction de l'âge (n=134)
B. Concentration d'AMH au diagnostic par classe d'âge

2 classes d'âge ont été constituées au sein de cet échantillon regroupant d'une part les patientes de moins de 35 ans (n=51) et celle d'âge supérieur ou égal à 35 ans (n=83).

Les patientes de moins de 35 ans présentent une moyenne d'âge de 31,37 ans contre 37,76 ans pour les plus de 35 ans. Aucune différence statistiquement significative sur l'âge n'a été mise en évidence entre les groupes de même âge avant et après exclusion des non dosables et des suspicions biologiques de SOPK.

Chez les patientes de moins de 35 ans, la concentration d'AMH moyenne est de 3,57 ng/mL statistiquement différente de celle calculée à 2,40 ng/mL chez les plus de 35 ans (Figure 19B).

III. Analyse des variations des concentrations d'AMH pendant la chimiothérapie

Au cours de la chimiothérapie, l'effectif de patientes a permis d'évaluer la décroissance de la concentration d'AMH après la 1ère cure (P2 ; n=123), 2ème cure (P3 ; n=129), 3ème cure (P4 ; n=125), 4ème cure (P5 ; n=126) et 5ème cure (P6 ; n=128).

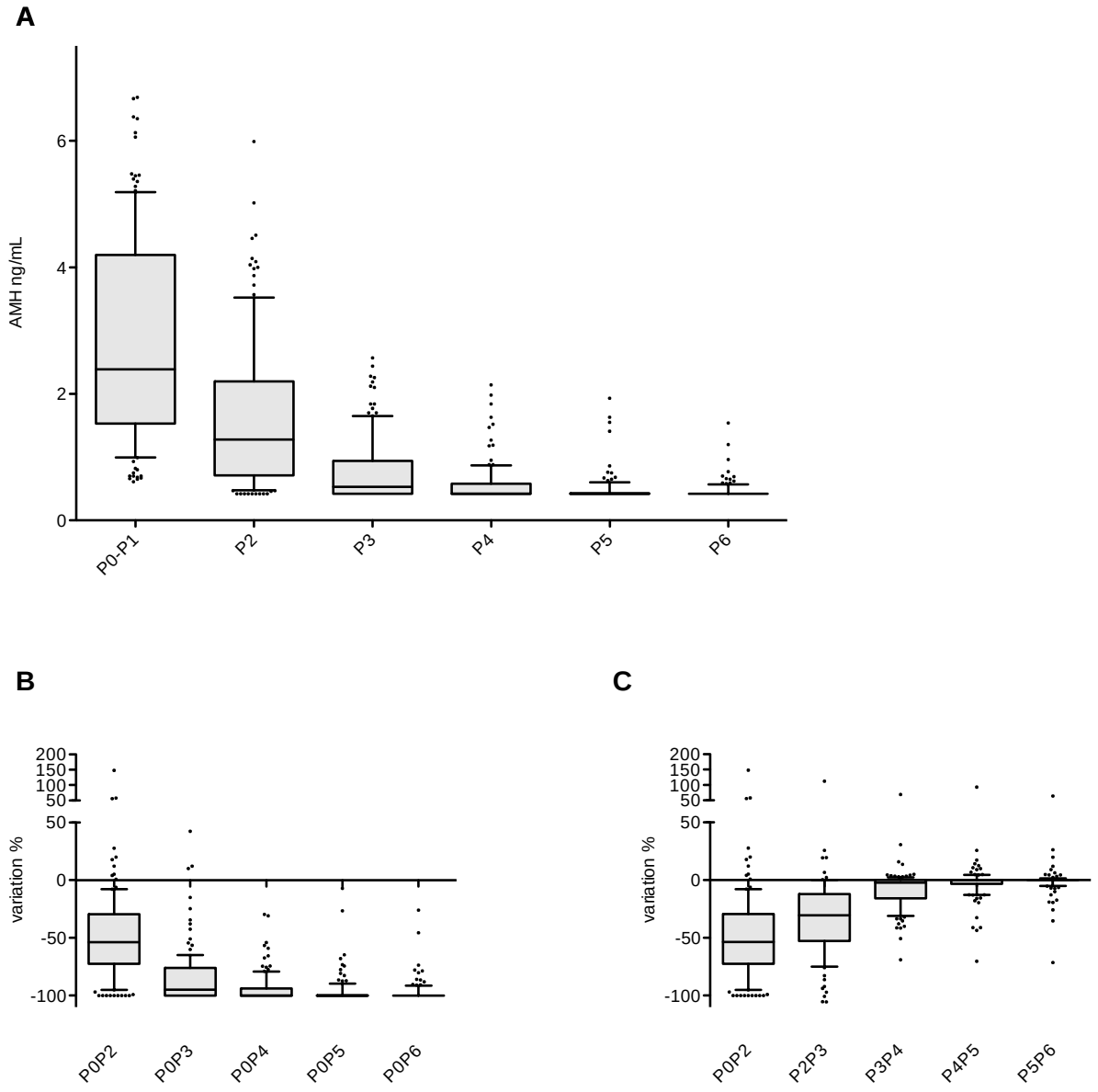


Figure 20 :
A. Concentration absolue d'AMH au décours de la chimiothérapie (n=134 à P0P1)
B. Variation cumulée de la concentration d'AMH après chaque cure exprimée en % d'AMH mesurable initiale
C. Variation intercure de la concentration d'AMH exprimée en % d'AMH mesurable initiale

a. Analyse de la concentration d'AMH après la 1ère cure de chimiothérapie (FEC 100)

- Variation en valeur absolue

Après la première cure de chimiothérapie (FEC), la valeur absolue de la concentration d'AMH passe en moyenne de 2,84 ng/mL (P0P1) à 1,63 ng/mL (P0P2) (n=134->n=123). La médiane chute également de 2,39 à 1,28 ng/mL (figure 20A).

- Proportion de patientes indétectables et détectables

L'AMH est indosable après le 1ere cure chez 9 patientes (7.4%). 28,5% des patientes présentent en effet une AMH entre 0.42 et 1ng/ml, 64,2% des patientes ont une concentration d'AMH supérieure à 1 ng/mL.

- Varation en % de concentration d'AMH initiale mesurable

La décroissance de la concentration d'AMH mesurable exprimée en % de la concentration initiale P0P2 (n=123) correspond à une diminution moyenne de – 49,21% IC 95% [-55,94 ; -42,49] avec une médiane à – 53,69%.

Sur la base des quartiles de variation d'AMH (P0P2%), on peut isoler 3 groupes de patientes:

-groupe 1 : premier quartile de décroissance P0P2% (décroissance modérée inférieure à -29,37%) (n=31),

-groupe 2 : 2ème et 3ème quartile de décroissance (décroissance moyenne comprise entre -29,37 ; -72,58 (%)) (n=62),

-groupe 3 : 4ème quartile de décroissance P0P2% (décroissance forte supérieure à la -72,58%) (n=31).

Dans le groupe 1, 9 patientes présentant une variation positive avec une concentration d'AMH initiale moyenne de 1,1 ng/mL IC [0,78 ; 1,41]. Le minimum de ces patientes était de 0,61 et le maximum de 1,82 ng/mL. L'âge moyen de ces patientes est de 35,85 ans, IC 95% [33,77 ; 37,94].

Les patientes présentant une variation modérée comprise entre 0 et -29,37% avaient une concentration d'AMH initiale à 3,5 ng/mL IC [2,56 ; 4,47] écart type de 1,79 ng/mL pour un minimum à 0,93 et un maximum à 6,69 ng/mL. L'âge moyen de ces patientes est de 33,21 ans, IC 95% [31,45 ; 34,96].

Les patientes à décroissance forte (groupe 3) avaient une concentration d'AMH initiale moyenne de 2,08 ng/mL, IC 95% [1,56 ; 2,59] et un âge moyen de 37,40 ans.

- Comparaison des groupes de décroissance en fonction de l'AMH initiale et de l'âge

Les concentrations d'AMH moyennes au diagnostic sont de
-2,83 ng/mL pour le groupe 1 (1er quartile de décroissance),
-3,12 ng/mL pour le goupe 2 (2ème et 3ème quartile réunis) et
-2,08 ng/mL pour le groupe 3 (dernier quartile).
Les concentrations d'AMH au diagnostic sont statistiquement différentes sur ces seuls deux derniers groupes (figure 21A).

Figure 21 :
A. Comparaison des concentrations d'AMH initiale des différents groupes de décroissance après la 1ère cure de FEC
B. Comparaison de l'âge au diagnostic des différents groupes de décroissance après la 1ère cure de FEC.

La comparaison de l'âge au diagnostic selon le profil de décroissance observée à la première cure évalue l'âge à :
-33,75 ans pour le groupe 1 (1er quartile de décroissance),
-35,24 ans pour le gourpe 2 (2ème et 3ème quartile réunis) et
-37,40 ans pour le groupe 3 (dernier quartile)
avec également une différence significative entre 2e et 3e groupe ainsi qu'entre le 1er et le 3e groupe.
Statistiquement les profils de décroissance plus rapide sont retrouvés dans le groupe d'âge le plus élevé (figure 21B).

b. Analyse de la concentration d'AMH après la 2ème cure de chimiothérapie (FEC 100)

- Valeur absolue

Après la deuxième cure de chimiothérapie (P3), la valeur de la concentration d'AMH passe en moyenne à 0,78 ng/mL avec une médiane à 0,53 ng/mL (n=129).

- Proportion de patientes indétectables et détectables

50 patientes soit 38,8% sont strictement non dosables avec notre technique, 39,5% des patientes ont une concentration d'AMH comprise entre 0,43 ng/mL et 1 ng/mL,

21,7% (n=28) supérieure à 1 ng/mL avec seulement 7 restant supérieur à 2 ng/mL pour un maximum à 2,57 ng/mL.

- Varation cumulée en % de concentration d'AMH initiale mesurable

La variation cumulée après les deux premières cures de chimiothérapie exprimée en % d'AMH pré thérapeutique mesurable (n=123) correspond à une diminution moyenne de -84,49% IC [-88,62 ;-80,36] pour une médiane à -94% .

A l'issue de 2 cures, 60,47% des patientes (n= 78) présentent une variation totale cumulée supérieure à – 72,58% : elles n'étaient que 25% à l'issue de la 1ère cure. Seules 2 patientes présentent une variation entre 0 et -24,62% (premier quartile de la première cure).

- Variation d'AMH mesurable imputable à la deuxième cure

La variation entre la 1ère et la 2ème cure (P2P3) est en moyenne de -35,10% IC95% [-28,20 ; -41,99] (médiane -30,64%).

Cette variation de la concentration d'AMH mesurable entre les 2 premières cures (P2P3) est inversement proportionnelle à la variation observée à l'issue de la première cure (P0P2) (r=0,77 p<0,001) (figure 7).

Si la perte d'AMH à l'issue de la première cure reste modérée pour certaines patientes, la décroissance cumulée à l'issue de la deuxième cure est similaire à celle qui décroissent d'emblée de façon majeure à l'issue de la première cure.

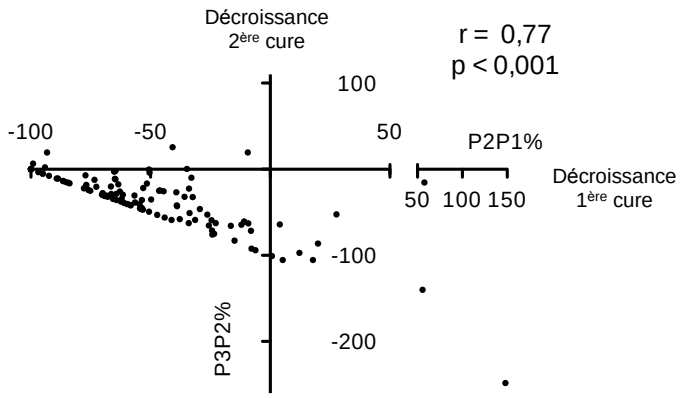


Figure 22 :
Réprésentation de la variation de la concentration d'AMH (% d'AMH mesurable initiale) à la 1ère cure (P2P1%) en fonction de la variation imputable à la 2ème cure (P3P2%)

c. Analyse de la concentration d'AMH après la 3ème cure de chimiothérapie (FEC100)

- Valeur absolue

Après la troisième cure (P4), la concentration moyenne d'AMH est de 0,58 ng/mL avec une médiane à 0,42 ng/mL. Le 75ème percentile est à 0,58 ng/mL (n=125).

- Proportion de patientes indétectables et détectables

56,8% des patientes sont non dosables (n=71), 32,8% ont une concentration d'AMH comprise entre 0,42 et 1 ng/mL (n=41).

Seules 9 patientes sont dosables entre 1 et 2,14 ng/mL âgée de 24,94 à 37 ans au diagnostic avec une concentration d'AMH préthérapeutique moyenne de 4,31 ng/mL (min =2,48 ng/mL ; max= 6,38 ng /mL).
La décroissance cumulée de ces patientes s'échelonne :
-à P2 : moyenne de -36% (min = -23,38% ; max = -50,60%)
-à P3 : moyenne de -59% (min = -15,02% max = – 98%)
-à P4 moyenne à -66,25% (min = -30,90% ; max = -87,24%).

- Varation cumulée en % de concentration d'AMH initiale mesurable

La perte cumulée à P4 pour l'ensemble des patientes évaluable est à -93,95% de l'AMH initiale IC 95% [-91,75 ;-96,16] avec un écart type de 12,44%. Le 75ème percentile est à -93,82%.

- Variation d'AMH mesurable imputable à la troisième cure

La variation entre la 2ème et la 3ème cure (P3P4) est en moyenne de -9,88% IC 95% [-5,94 ; -13,8%].

d. Analyse de la concentration d'AMH après la 4ème cure de chimiothérapie (Taxotère®)

- Valeur absolue

Après la 4ème cure, la concentration moyenne d'AMH est de 0,5 ng/mL (médiane = 0,42 ng/mL) (n=126).

- Proportion de patientes indétectables et détectables

Après la 4ème cure (P5), 76,2% des patientes sont non dosables (n=95). 21,4% des patientes sont dosables inférieures à 1 ng/mL(n=27). Seules 4 patientes ont une concentration d'AMH > 1ng/mL mais restant inférieure à 2 ng /mL : ces patientes sont âgée de 26,91 à 34,77 ans et leur concentration d'AMH préthérapeutique étaient de 2,48 à 6,69 ng/mL.

- Varation cumulée en % de concentration d'AMH initiale mesurable

La perte cumulée à P5 en % de la concentration d'AMH pré thérapeutique est de –96,35% en moyenne IC 95% [-94,23 ; -98,47].
Le 75ème percentile de la population est à -99,79%.

- Variation d'AMH mesurable imputable à la quatrième cure

La part liée à la 4 ème cure dans la variation cumulée à P4 est en moyenne de -1,96% avec IC 95% [0,60 ; -4,52].

e. Analyse de la concentration d'AMH après la 5ème cure de chimiothérapie (Taxotère®)

- Valeur absolue

Après la 5ème cure (P6), la concentration moyenne d'AMH est de 0,46 ng/mL (médiane = 0,42 ng/mL) (n=128).

- Proportion de patientes indétectables et détectables

79,7% des patientes ont une concentration d'AMH non dosable (n=102). 18,8% des patientes ont une concentration d'AMH comprise entre 0,42 et 1 ng/mL (n=24) en moyenne à 0,57ng/mL (ET= 0,12 ng/mL). Leur perte cumulée est de -88,88% avec une concentration d'AMH initiale de 2,70 ng/mL et un âge de 36,76 ans.

Seules 2 patientes ont une concentration d'AMH > 1 ng/mL pour des valeurs retrouvée à 1,20 et 1,54 ng/mL. Elles avaient respectivement au diagnostic 32,95 ans et 34,77 ans ainsi que des concentrations d'AMH de 3,94 et 2,48 ng/mL.

- Varation cumulée en % de concentration d'AMH initiale mesurable

Après la 5ème cure (P6), la perte cumulée moyenne d'AMH de -96,35%.

- Variation d'AMH mesurable imputable à la 5ème cure

La perte imputable à la dernière cure est de -0,76% IC 95% [1,16 ; -2,7].

f. Particularités des patientes SOPK en fin de chimiothérapie (n=25)

A la sixième visite, 21 patientes ont eu 1 prélèvement : 17 sont non dosables, 3 dosables mais avec une concentration inférieure à 1 ng/mL et 1 patiente à 44,80 ng/mL (AMH initiale à 47,50 ng/mL).
Pendant la dernière cure de chimiothérapie, 15 patientes n'ont pas présenté de règles (5 sur les 3 derniers cycles consécutifs, 5 sur 2 et 5 uniquement au dernier). 8 patientes conservent des règles, 2 n'ont pas répondu.

IV. Comparaison des variations de concentration d'AMH au cours de la chimiothérapie

a. Effet de l'âge

En considérant les 2 classes d'âge inférieure à 35 ans et supérieure ou égale à 35 ans, on observe dans la classe d'âge la plus jeune suite à la première cure de chimiothérapie, une décroissance moyenne de la concentration d'AMH mesurable de l'ordre de -39,23% (médiane = – 37,78%). Dans la classe des 35 ans et plus, la décroissance moyenne de la concentration d'AMH est de l'ordre de – 54,98% (médiane = -60,41%).
Les moyennes de décroissance de l'AMH après la première cure de chimiothérapie dans ces groupes d'âge différent est statistiquement différente ($p<0,02$) (figure 23 A).
Le test de Spaerman retrouve une corrélation entre l'âge et la décroissance après la première cure (P0P2%) ($r=-0,34$ $p<0,001$).

A l'issue de la deuxième cure, la différence statistique entre les groupes d'âge persiste : la moyenne de décroissance de l'AMH pour les moins de 35 ans est de -77,99% (médiane -83,59%) contre une moyenne pour les 35 ans et plus de -88,21% (médiane de -97,73%) (figure 23 B).

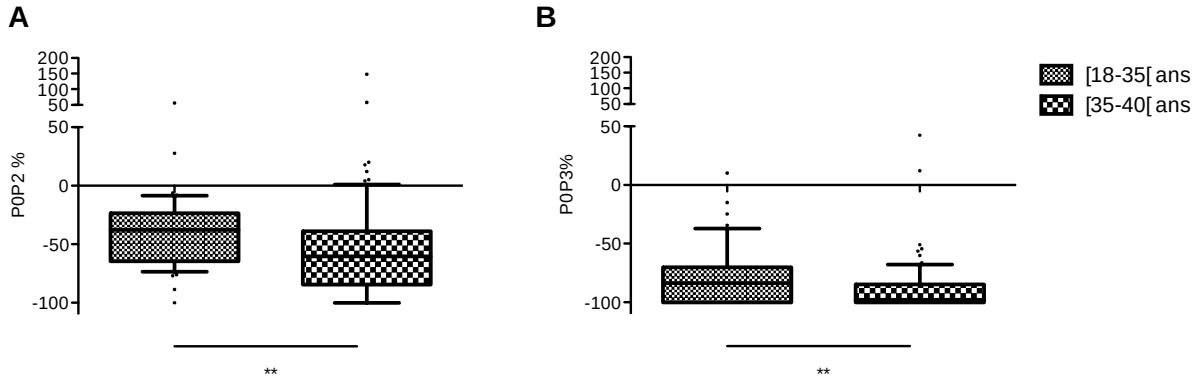


Figure 23 :
A. Variation de la concentration d'AMH mesurable exprimée en % d'AMH initiale évaluée à l'issue de la 1ère cure en fonction des classes d'âge
B. Variation de la concentration d'AMH mesurable exprimée en % d'AMH initiale évaluée à l'issue de la 2ème cure en fonction des classes d'âge

A partir de la troisième cure de chimiothérapie, la décroissance cumulée est déjà telle avant la cure qu'il n'y a pas de différence statistiquement observable entre les classes d'âge à P4 P5 et P6.

b. Effet de la valeur absolue de la concentration d'AMH préthérapeutique

Au diagnostic, 2 groupes de patientes peuvent être constitués en fonction de la moyenne arithmétique des concentrations d'AMH retrouvées à P0 et P1 :

- un groupe (n=56) pour lequel cette concentration est dosable et inférieure à 2 ng/mL. La moyenne de la concentration d'AMH pré thérapeutique dans ce groupe est de 1,33 ng/mL (médiane=1,37 ng/mL ; min= 0,61 ng/mL ; max= 1,96 ng/mL). Ces patientes sont âgées en moyenne de 36,69 ans (médiane= 37,53 ans ; min= 39,35 ans et max= à 39,96 ans).

-un groupe (n=78) pour lequel la concentration initiale est supérieure ou égale à 2 ng/mL et inférieure à 7 en moyenne à 3,92 ng/mL ; médiane= 3,78ng/mL ; min= 2 et max= 6,69 ng/mL). Leur âge est en moyenne à 34,35 ans (médiane =35 ans min= 24,77 et max= à 39,95 ans).

Après la 1ère cure, la décroissance observée dans le groupe AMH<2 ng/mL (n=53) est en moyenne à -48,99% médiane à -61,02%: la dispersion est grande du fait du CV de la méthode d'analyse. Dans le groupe AMH entre 2 et 7 ng/mL la moyenne de la concentration d'AMH observée à P2 (n=70) est -49,38% et la médiane de -59,49%. Aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence à cette visite dans ces 2 groupes (figure 24 A).

Le test de Spaerman ne montre pas de corrélation entre la concentration d'AMH pré-thérapeutique (P0P1 en ng/mL) et la décroissance observée (P0P2%) (r=0,12 NS).

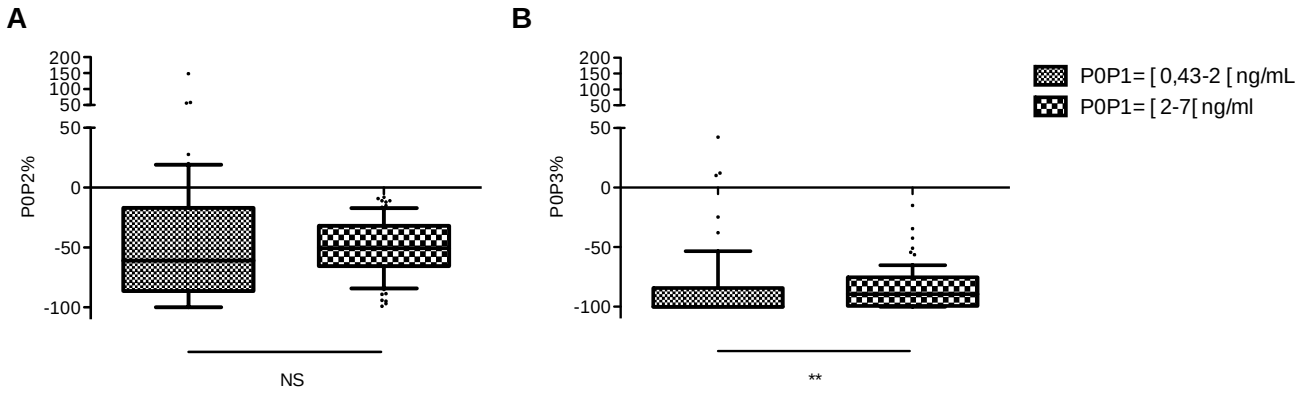


Figure 24 :
A. Variation de la concentration d'AMH mesurable exprimée en% d'AMH initiale évaluée à l'issue de la 1ère cure en fonction des classes d'AMH initiale
B. Variation de la concentraiton d'AMH mesurable exprimée en % d'AMH initiale évaluée à l'issue de la 2ème cure en fonction des classes d'AMH initiale

Après la deuxième cure, la décroissance cumulée de la concentration d'AMH (% d'AMH initiale) dans le groupe 0,43 à 2 ng/mL est en moyenne de – 84,99% médiane à -100%.
Dans le groupe d'AMH initiale [2 ;7 [, la moyenne est à -84,10% mais avec une médiane de -89,29%, un ET de 17,21%.
La différence est statistiquement significative (figure 24B).

V. Description du moment d'indétectabilité

La concentration d'AMH à 0,50 ng/mL peut être considéré analytiquement non différente des concentrations rendues indosables du fait des performances connues de la méthode.

Les patientes de plus de 35 ans présentent une moyenne d'atteinte statistiquement différente de celle des moins de 35 ans à P3 (3,11) versus P4 (3,93) soit après 2 cures environ pour les plus de 35 ans contre 3 pour les plus jeunes.
L'atteinte du taux d'indétectabilité est également différente entre les groupes de patientes à AMH dite faible au diagnostic (0,43 ng/mL à 2 ng/mL) à P3 (2,88) comparé à la moyenne de P4 (3,83) pour le groupe de patientes à concentration d'AMH pré thérapeutique de 2 à 7 ng/mL correspondant aux 2ème et 3ème cures.

temps d'indétectabilité en nombre de prélèvement	[18-35[ans	[35-40[ans	p	P0P1 = [0,43;2[ng/mL	P0P1=[2;7[ng/mL	p
moyenne	3,93	3,11	<0,001	2,88	3,83	<0,001
médiane	3,93	2,91		2,83	3,90	
écart-type	1,01	1,00		0,88	1,05	
min-max	1,65-5,93	1,71-6,00		1,65-6	1,92-6	

Tableau 6 : Caractéristiques du moment d'indétectabilité per-chimiothérapie selon les classes d'âge et de concentration d'AMH au diagnostic

VI. Description du statut menstruel à la dernière cure de chimiothérapie

A la fin du cycle de chimiothérapie, 63,6% des patientes déclarent ne pas avoir eu d'épisode de menstruations pendant le dernier mois de cure, 36,4% en présentent.
Il convient de noter que ces 48 patientes rapportant des règles pendant cette dernière cure ont conservé (contrairement aux autres) des cycles pendant toute la durée de la chimiothérapie.
Les concentrations d'AMH préthérapeutique, la décroissance cumulée à l'issue de 5 premiers cycles de chimiothérapie ainsi que la concentration résiduelle au sein de ces 2 groupes ne différent pas.
Seuls diffèrent l'âge et surtout les décroissances cumulées de l'AMH exprimée en % d'AMH initiale au 1ère et 2ème cure de chimiothérapie. Les femmes ayant conservé des règles étant plus jeunes et ayant une décroissance d'AMH moins rapide que les femmes sans règles à P6.

	persistance des règles à P6			absence de règles à P6			test statistique
	n=48			n=84			
	moyenne	écart-type	médiane	moyenne	écart-type	médiane	
AMH P0P1 ng/mL	3,04	1,71	2,48	2,73	1,60	2,27	NS
delta P0P6 %	-96,21	14,36	-100	-97,98	5,22	-100	NS
AMH P6 ng/mL	0,48	0,20	0,42	0,47	0,10	0,42	NS
âge au diagnostic	34,22	3,84	34,93	35,78	3,78	36,86	<0,05
delta P0P2 %	-33,62	42,17	-34,35	-57,46	33,31	-62,76	<0,001
delta P0P3 %	-81,21	17,02	-84,69	-85,30	26,07	-96,80	<0,01

Tableau 7 : Caractéristiques des patientes présentant ou non des règles pendant la 6ème cure de chimiothérapie

DISCUSSION

Cette étude s'inscrit dans la continuité des travaux visant à caractériser l'évolution de la réserve ovarienne des patientes jeunes traitées par chimiothérapie pour cancer du sein. Le dosage de l'hormone anti-Müllerienne sérique est actuellement le marqueur biologique le plus consensuel, permettant une évaluation peu invasive dans ce contexte.

La population étudiée, jeune, forte d'un effectif important et soumise à un même régime de chimiothérapie permet de retrouver au diagnostic la corrélation d'ores et déjà démontrée de l'âge et de la concentration sérique de ce marqueur.

En fin de chimiothérapie, près de 80% des patientes présente une concentration d'AMH non dosable, pourcentage passant à 98% de patientes inférieures à 1 ng/mL. Cette valeur ponctuelle est non discriminante : la cinétique de la concentration d'AMH associée à l'évaluation clinique des menstruations en fin de chimiothérapie est plus informative.

Après deux cures de FEC, la concentration d'AMH décroît en moyenne de 84%. Sur les 2 premières cures, la vitesse de décroissance diffère significativement selon les groupes d'âge et de concentrations préthérapeutiques d'AMH. Les variations sont en effet plus marquées chez les patientes de plus de 35 ans et dans une moindre mesure chez celles présentant dès le diagnostic une concentration d'AMH inférieure à 2 ng/mL. En cohérence avec ces résultats, l'indetectabilité est atteinte aux alentours de la 2ème cure pour les plus de 35 ans ou d'AMH préthérapeutique inférieure à 2 ng/mL au diagnostic versus 3ème cure pour les moins de 35 ans ou d'AMH préthérapeutique mesurée entre 2 et 7 ng/mL.

En considérant le statut menstruel en fin de chimiothérapie, 36,4% des patientes déclarent avoir conservé leurs règles pendant toute la durée de la chimiothérapie. La concentration d'AMH pré-thérapeutique chez ces patientes ne diffère pas de celles déclarant une absence de règles au dernier cycle. Ces patientes conservant à priori une fonction ovarienne diffèrent sur l'âge et plus sensiblement sur une vitesse de décroissance de la concentration d'AMH plus faible en début de la chimiothérapie.

I. Analyse de la population étudiée

Les caractéristiques générales de la population étudiée sont similaires aux données épidémiologiques publiées dans la littérature et répondent aux recommandations de prise en charge du cancer du sein des femmes jeunes âgées de moins de 40 ans.

a. Démographie

La cohorte RESOVA de 250 patientes recrutées entre janvier 2010 et juillet 2011 correspond à une proportion non négligeable des cas incidents de cancer du sein de la femme de moins de 40 ans. En effet, l'InVS rapporte pour cette classe d'âge en 2012, 2344 diagnostics représentant 4,81% de l'ensemble des nouveaux cancers du sein diagnostiqués. Ce chiffre de 4,81% est cohérent avec les autres données épidémiologiques en Europe et en Amérique du Nord : 6,6% entre 2000 et 2005 aux Etats-Unis (157) et 6,4% d'après une étude rétrospective sur 243012 cancers du sein entre 1988 et 2003 (158).

Dans notre étude, la part de femmes âgées de plus de 35 ans est de 59,39%. En France en 2012, parmi les femmes de moins de 40 ans nouvellement diagnostiquées, les cas concernent majoritairement les plus de 35 ans avec 71,2% des cas, suivi des 30-34 ans (21,6%) et des 20-29 ans (7,2%). Seuls 18 cas ont été diagnostiqués entre 20 et 24 ans. Le constat est sensiblement le même aux Etats-Unis : 63,6% de 35-40 ans ; 26,5% de 30-35 ans et 9,9% de 20-30 ans.

b. Antécédents et hérédité

Au diagnostic, toutes classes d'âge confondues, 10 à 15 % des femmes relatent un antécédent familial de cancer du sein (159). Environ 5% de tous les cancers du sein sont associés à une prédisposition monogénique identifiable à ce jour.

Les mutations constitutionnelles des gènes BRCA1 et 2 sont identifiées chez 20 à 40% des cancers du sein associés à des antécédents familiaux, représentant ainsi environ 2-3% des cancers du sein (160). L'étude présentée est donc cohérente avec 9,09% de gènes BRCA1/2 mutés et la notion d'antécédents familiaux de cancers du sein décrits par 45,45% des patientes.

Les cancers du sein des femmes BRCA1 et 2 mutés survenant plus précocement que les cas sporadiques, la probabilité de trouver une mutation chez les femmes jeunes est en effet plus élevée : cette fréquence est d'au moins 16% pour les cancers du sein survenant avant 30 ans (161).

c. Diagnostic histologique et moléculaire

Les cancers du sein de la femme de moins de 40 ans sont différents de ceux dignostiqués chez les femmes plus âgées : les carcinomes in situ sont plus rares, la proportion de lobulaire diminue au profit des canalaires (162) (RESOVA 3FEC+3 à 4 TAX : 92,7% d'adénocarcinome canalaire).

Dans les populations dites d'origine caucasienne de moins de 40 ans, la proportion de grade II et III est plus élevée que chez les patientes plus âgées : de l'ordre de 89% (RESOVA : 92,7%), les stades métastatiques restent rares au diagnostic (1% versus 3% pour RESOVA).

Nous retrouvons les différences de fréquences relatives des types moléculaires par rapport aux plus de 40 ans :
-le type luminal A associé au meilleur pronostic est de 63,89% contre 83,33%
-le profil luminal B (expression moins forte des RH) est à 13,89% contre 6,06%
-la proportion de tumeurs triple négative augmente de l'ordre de 16,66% (RESOVA :16,97%) contre 6,06%

-la proportion de tumeur exprimant HER2 est également augmentée 19,44% (RESOVA : 24,95%) contre 10,61% (163).

d. Prise en charge

Le régime de chimiothérapie associant 3 cures de FEC suivi de 3 cures de Taxotère® est un standard recommandé en France par la conférence de consensus Saint Paul de Vence en 2011 pour toute tumeur N+ ou HER2+ et reste une alternative fréquente pour les N-/ HER2- (164,165).
Les fréquences élevées de tumeurs triples négatives et HER2+ et la prise en charge en CRLCC expliquent la proportion élevée de chimiothérapie néoadjuvante et de patientes incluses dans des essais cliniques (166,167).

II. Méthode de dosage et normogramme de la concentration d'AMH

a. Aspects analytiques

Avant de confronter nos résultats à ceux publiés dans la littérature, il convient d'attirer l'attention sur l'état actuel des possibilités analytiques du dosage de l'AMH. Si la proportionnalité de l'AMH et du compte folliculaire antral a été démontrée, les différentes techniques existantes n'ont pas les mêmes performances analytiques. Il n'existe pas de standart international pour le moment et les valeurs de référence de l'AMH en fonction de l'âge diffèrent selon les techniques.

Différentes générations de techniques de dosage ont existé depuis les années 90. La technique de dosage que nous avons utilisé pour cette étude correspond à la trousse commercialisée par Beckmann-Coulter™ basée sur le principe développé initialement par Immunotech™ (Marseille, France). Comme toutes les techniques manuelles existantes pour l'AMH, il s'agit d'un immuno-dosage de type ELISA

sandwich. Elle utilise des anticorps monoclonaux anti AMH humaine dirigés contre les régions N et C terminales de l'AMH ; le standard est de l'AMH recombinante humaine (présence d'albumine bovine dans le calibrateur) , la gamme de calibration est réalisée par dilution dans un calibrateur dit « 0 » d'origine humaine dépourvu d'AMH. Le domaine de mesure s'étend jusqu'à 21 ng/mL. La limite de détection affichée par le fournisseur est à 0,1 ng/mL, mesurée à 0,13 ng/mL avec une sensibilité fonctionnelle à 0,35 ng/mL publiée par Taieb et al. et non le fournisseur (1ng/mL=7,14pmol/L) (168). Dans notre laboratoire, la sensibilité fonctionnelle est de 0,42 ng/mL, premier point de calibration.

Parmi les autres techniques qui ont été disponibles sur le marché, la technique DSL™ (dérivée ou complétée par celle d'Al qhatani) a également été utilisée dans les études antérieures. La calibration est réalisée à partir d'un standard à base d'AMH bovine à partir duquel la gamme d'étalonnage est reconstituée par dilution dans un calibrateur 0 à type de tampon protéique d'origine animale. La limite supérieure de mesure est de 14 ng/mL avec une limite de détection affichée à 0,006 ng/mL mesurée à 0,10 ng/mL et une sensibilité fonctionnelle à 0,30 ng/mL.

Plusieurs équipes se sont attachées à comparer ces 2 techniques : leurs résultats sont hétérogènes dans le temps, la technique DSL™ croise avec les TGF beta d'origine animale, elle donnerait des résultats 3 à 4 fois inférieurs à BC Immunotech™ selon certaines études (169), ne serait corrélée que dans les valeurs inférieures à 10ng/mL pour d'autres (168) : la technique DSL aurait évolué dans le temps.

A la suite de la fusion des fabricants BC™ et DSL™, une troisième technique a vu le jour et est la principale technique utilisée dans les études sur l'AMH depuis 2010. Il s'agit de la technique dite BC II™ utilisant les anticorps de DSL™ avec un standard d'origine bovine calibrée sur la technique Immunotech™ avec une sensibilité affichée à 0,08 ng/mL. En décembre 2012 et juin 2013, le fabricant a notifié à ses utilisateurs que les échantillons dilués pouvaient donner des résultats faussement élevés puis que les échantillons non dilués pouvaient donner des résultats faussement négatifs par interférence avec le complément sur la base de l'étude de Rustamov (170). Une étude plus récente encore ajoute que ces incertitudes quant aux résultats obtenus avec BC II™ seraient majorées par la variabilité des conditions préanalytiques du prélèvement avec une augmentation des concentrations lors de la conservation de l'échantillon à température ambiante ou lors de la dilution de l'échantillon dans le tampon prévu à cet effet (171). La dissociation des 2 régions de l'AMH liée par de ponts di sulfures ou son clivage in vitro pourraient éventuellement expliquer ces phénomènes.

L'utilisation des facteurs de conversion entre les différentes techniques, pourtant publiés, n'est pas recommandée (172), la plus grande prudence doit donc être accordée à l'interprétation des concentrations d'AMH que ce soit dans la comparaison aux normogrammes ou aux valeurs publiées dans les études sur le suivi de l'AMH comme marqueur de réserve ovarienne (173). La technique BC Immunotech™ calibrée sur de l'AMH recombinante humaine semble la moins sujette à controverse.

b. Normogramme

Différentes équipes ont tenté d'établir des valeurs de référence. Pour la méthode BC Immunotech™, il n'existe que celles publiées par La Marca réalisées sur des échantillons de femmes ne consultant pas pour infertilité, sans contraception depuis plus de 6 mois, avec des cycles compris entre 25 et 35 jours, sans signes d'hyperandrogénie et en l'absence de chirurgie gynécologique au moment du prélèvement. La première étude (n=277) (tableau 8) a été complétée donnant les résultats concordants de la seconde (n=416) (figure 25) (60,81)

	Age (années)				
Percentile	[18-30]	[31-35]	[36-40]	[41-45]	[46-50]
2.5	0.52 (0.11–0.96)	0.35 (0.11–0.79)	0.33 (0.26–0.51)	0.26 (0.25–0.39)	0.22 (0.18–0.31)
5	0.87 (0.5–1.27)	0.64 (0.11–1.12)	0.48 (0.26–0.6)	0.36 (0.25–0.51)	0.32 (0.2–0.43)
10	1.27 (0.96–1.68)	0.93 (0.64–1.66)	0.6 (0.48–1.37)	0.42 (0.38–0.6)	0.42 (0.35–0.5)
25	2.5 (1.7–3.26)	1.88 (1.63–2.69)	1.71 (1.25–2.42)	0.78 (0.6–0.99)	0.76 (0.53–0.91)
50	4.10 (3.61–4.98)	3.46 (2.87–4.08)	3 (2.65–4.46)	1.38 (1–1.75)	1.1 (0.8–1.41)
75	6.3 (5.45–7.58)	6.08 (4.65–7.65)	5.3 (4.59–6.67)	3.56 (1.96–5.39)	2.8 (2–3.6)
90	8.68 (7.88–10.89)	8.19 (7.63–9.97)	7.89 (6.67–13.9)	7.70 (4.68–12.29)	5.5 (3.2–9.7)
95	10.98 (8.92–12.09)	9.97 (8–34–12.44)	8.67 (7.97–12.95)	8.29 (6.55–12.61)	6.92 (4.98–8.7)
97.5	12.01 (10.27–13.08)	11.84 (10.14–12.44)	9.68 (8.45–12.75)	8.78 (7.2–12.6)	6.34 (3.9–7.5)

Tableau 8 : Distribution des concentrations d'AMH en ng/mL (IC 90%) en fonction de l'âge (60)

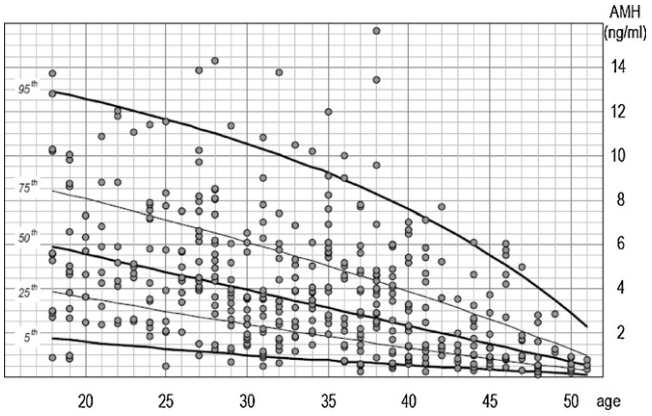


Figure 25 : Percentiles et valeurs observées de concentrations d'AMH sérique (ng/mL) (81)

c. Appréciation des concentrations d'AMH au diagnostic chez les patientes sélectionnées

Avant exclusion des patientes à concentration préthérapeutique d'AMH<0,42 ou > 7 ng/mL, les médianes 25ème et 75 ème percentiles des concentrations d'AMH des 165 patientes sont sensiblement plus élevées et en dehors des intervalles de confiance calculés dans l'étude de détermination des valeurs normales de La Marca.

Contrairement à cette étude, les patientes de la cohorte RESOVA n'ont pas été recrutées ni exclues sur les caractéristiques de leur cycle, de même pour les signes d'hyperandrogénie : caractéristiques qui peuvent expliquer ces valeurs augmentées.

Le déclin des concentrations d'AMH avec l'âge est retrouvé dans notre cohorte avec une corrélation plus modeste que dans la littérature. Contrairement aux hémopathies malignes (174), le cancer du sein ne serait pas à l'origine d'une altération de la

réserve ovarienne avant toute intervention thérapeutique, constat concordant avec l'étude cas témoin de Su (175).

d. Exclusion de l'analyse de décroissance des patientes à concentration d'AMH pathologique au diagnostic

La proportion de patientes ayant une concentration initiale < 0,42 ng/mL (3,6%) est cohérente avec les valeurs des 5èmes percentiles observées par La Marca : ces patientes présentent probablement une insuffisance ovarienne précoce.

La définition des concentrations d'AMH compatibles avec un syndrome vrai des ovaires polykystiques n'est pas consensuelle, affection touchant 5 à 10% des femmes associant à divers degrés hirsutisme, acné, irrégularité menstruelle et dysovulation à une sécrétion augmentée d'AMH par les cellules de la granulosa d'un pool folliculaire antral également augmenté (172). Plusieurs seuils d'AMH déterminés en technique BC™ ont été proposés comme critère diagnostic de ce syndrome allant de 4,9 à 8,40 ng/mL (156,176). Une AMH élevée est un signe de dysfonction folliculaire et on peut supposer que la réserve ovarienne de ces patientes réagisse différemment à la cytotoxicité des chimiothérapies, justifiant l'exclusion des patientes à AMH > 7ng/mL correspondant au 85eme percentile de notre échantillon au diagnostic.

Ce choix permet de décrire l'évolution de l'AMH sous chimiothérapie chez des femmes présentant à priori un fonction ovarienne évaluable ou normale au diagnostic quelle que soit la réserve ovarienne disponible.

III. Suivi de la concentration d'AMH

De 2006 à mars 2014, différentes études ont été publiées, s'intéressant à l'évolution de l'AMH et des cycles menstruels de femmes non ménopausées traitées par chimiothérapie pour cancer du sein. Les caractéristiques et résultats de ces études limitées aux prospectives sont présentés dans le tableau 9.

a. Effectif de la population

Notre étude se distingue par le nombre de sujets inclus (n=250) et constitue à ce jour une des plus importantes cohortes constituées pour le suivi de la réserve ovarienne pendant et après traitement du cancer du sein. Les études traitant du même sujet ont inclus de 26 à 124 patientes.

b. Protocoles de chimiothérapie

La cohorte RESOVA comprend 165 patientes traitées par le même protocole de chimiothérapie 3 FEC + 3 à 4 Taxotère® qui, isolées des autres patientes, suppriment l'hétérogénité de cytotoxicité induite par la multiplicité des protocoles. Les autres études ont en effet inclus des patientes traitées par 3 à 9 protocoles différents de durée souvent variables (4 à 9 mois). De plus, ce traitement étant un standard, la description de ces effets sur la fonction ovarienne fait certainement partie de attentes des oncologues et des spécialistes en médecine de la reproduction chargés de proposer les solutions existantes et personnalisées de préservation de la fertilité.

c. Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion de ces études sont basés sur l'état « non-ménopausé » des femmes le plus souvent déterminé sur la persistance des règles ou sur des taux de gonadotrophines non évocateurs de ménopause. De plus, la fréquence acceptée de règles est large allant de la persistance de règles dans les 3 à 6 mois voire dans l'année tout en sachant que les concentrations de gonadotrophines évocatrices de ménopause sont tardives en général mesurées après la disparition des règles.

Ces critères d'inclusion expliquent l'étendue de l'âge des patientes recrutées dans ces études ainsi que l'âge médian constaté. Les maximums dépassent les 50 ans et les âges médians les 40 ans. Si ces patientes ne sont pas ménopausées, elles ne se situent plus pour la plupart dans leur période de fertilité, plus probable en adoptant le critère d'inclusion de RESOVA sur l'âge strictement inférieur à 40 ans. L'âge médian de nos patientes à 36,21 ans devient pertinent au regard du fait qu'en 2010 en France, près d'un enfant sur cinq naissait d'une mère âgée de 35 ans ou plus (177).

étude	anderson 2006	anders 2008	Yu 2010	anderson 2011	anderson 2013	lynn henry 2014	ruddy 2014	RESOVA 3 FEC + 3/4 TAX
nb de patientes	56	44	26	56	59	27	124 (1A)	165
nb sous chimiothérapie	42	44	26	42	59	27	124	165
nb de protocoles différents de chimiothérapie	7	9	3	4	8	5	3	1
durée chimiothérapie	6 à 9 mois	NR	NR	6-8-12 cycles	4 à 7 mois	NR	NR	6 à 7 mois
nb sous hormonothérapie post chimiothérapie	35/42	27/44	17/26	38/42	52/59	21/27	64/124	114
patientes sans chimiothérapie	14	0	0	14	0	0	0	0
âge médian au diagnostic	41(28-52)	40 (21-51)	37 (27-40)	NR	42,6(23,3-53,5)	41(25-50) 4 cohortes d'âge de même effectif	45 (25-55)	35,72 (24,77-39,96)
type de cancer du sein	opérable	opérable I à III	opérable	opérable	opérable	opérable I à III	risque élevé	I à III
statut ménopausé à l'inclusion	neg	neg	NR	NR	neg	neg	NR	neg
critères de préménopause	tx de gonadotrophines ou règles régulières	2 règles dans les 180 jours avant inclusion	critère NR (<40ans)	règles régulières sans contraception orale	tx de gonadotrophines et règles régulières sans contraception orale	règles dans les 3 mois précedents	règles dans l'année précédente	NA (exclusion si comorbidité liée à la fertilité)
réactif AMH	al qahtani	DSL	DSL	BC II	BC II	BC II	BC II	BC Immunotech
durée du suivi post diagnostic	6 M	18 M	12 M	4-5 A	2 A	18 M	18 M	6M (->24 M)
mesure AMH pré chimiothérapie	Oui	Oui (n=41)	Oui	Oui	Oui	Oui (n=26)	Oui (n=100)	Oui (n=165)
valeur moyenne AMH pré chimiothérapie	1,11 ng/mL +/- 0,20	0,7 ng/mL (0,006-7,9)	0,86 ng/mL (0,07-9,1)	1,29 ng/mL +/- 0,21	7,9+/- 1,3 pmol/L	1,95 ng/mL	0,11 ng/mL (0,01-8,63)	4,23 ng/mL +/-5,40 ng/mL
AMH per chimiothérapie	3M	NR	6S 12S	NR	1 cycle	NR	NR	après 1;2;3;4;5 cycles de CT
AMH suivi	6 , 9 et 12 M après début CT	6M(n=16) et 12 M (n=21) ap fin CT	36 S 52 S après début CT	2A;3A;4A(n=35);5A(n=33)	1A(n=55);2A(n=46)	1 A (n=22)	12M(n=124) et 18M(n=100)	prévu 6M 12M et 18 M post CT
AMH préthérapeutique en fonction de l'âge	AMH SS + élevée <35 ans : >2 ng/mL	AMH SS + élevée < 35 ans 2,72 ng /mL // 0,47 p< 0,0001	AMH non SS + élevée < 35 ans 1,7//0,5 p> 0,05	non calculé	correlation inversée âge Spearman Rho =-0,56 p<0,001	non calculé	non calculé	AMH SS + élevée <35 ans 3,57 ng/mL// 2,40 ng/mL
évolution AMH sous chimiothérapie	quasi indétectable 3M d ss// AMH initiale p< 0,001	non suivi	0,08 S6// 0,05 S12 p<0,05	non suivi	3,5 +/- 0,7 (préCT) p<0,001		non suivi	AMH indétectable à 2,11 cures >35 ans et 2,93 cures <35 ans
AMH en fin de chimiothérapie	NA	NA	INDETECTABLE	non mesuré	non mesuré	non mesuré	NA	86,4% non détectable avant la 6ème cure de CT
Aménorrhée après chimiothérapie	6 mois après début CT : 55%	1 an post fin CT : 16/21 soit 76,2%	1 an après début CT : 42%	4-5 après début CT: 76%	1A 45/55 soit 81,9% 2A après début CT 30/39 soit 76,9%	1M <0,16 ng/mL pour toutes les patientes 1A 8/22 (1 ovariectomie bilatérale) (1 seule AMH détectable)	12M : 102/124 soit 82,3% 18M:81/100 soit 81%	NA (63,6% sans règles avant la 6ème cure de CT , en irrégulaité menstruelle pendant la CT)
présence des règles	non évalué	1 an post fin CT : 5/21	1 an : 58%	5 ans 10/42: 24%	1A 10/55 2A 9/39 (exclusion goserelin)	1A 14 patientes /22 soit 63,6%	12M : 22/124 18M 18/100	avant 6ème cure : 36,4%(persistance pendant toute la CT)
âge des patientes en aménorrhée ou avec règles	44,4// 36,7 p < 0,001	44//40 p= 0,03	non calculé : mais 50% des > 35 ans et 25% des <35 ans	non calculé	1A :43,3//37,9 p=0,03 2A 43,9//37,9 p=0,004	non calculé	12M 46A 18M 46ans // RR+ 36,5 37 p<0,0001	34,22 si R+//35,78 si R- p>0,05
AMH initiale des patientes en aménorrhée ou avec règles	0,58 // 1,9 p= 0,007	0,16//1,09 p= 0,02	0,98//0,97 p> 0,05	0,7+/- 0,1// 2,5+/-0,4 p< 0,0001	1A: 6,6+/-1,5//16,6+/-4,8 p=0,01 2A : 4,0+/-0,9// 17,2+/-5,1 p<0,0001	non calculé	12M 0,08/1,3 18M 0,06/1,25 p<00001	3,04 ng/mL si R+/ 2,73 ng/mL si R- p>0,05
différence dans le suivi de l'AMH selon le statut menstruel à distance de la chimiothérapie	non évalué	0,07 ng/mL// 0,03 ng/mL	non détectable	NA	NA	NA	NA	après 1ère cure de CT : delta AMH -33,22% si R+ à P6/-57,46% si R- à P6
AMH mesurée au point d'aménorrhée	non évalué	quasi ND (0,03 ng/mL)	quasi ND	0,06+/-0,01//0,16+:-0,05 p=0,004	non évalué	6/7 ND	non évalué	0,48 ng/ml si R+/0,47 ng/mL si R- p>0,05
différence entre protocoles de chimiothérapie	oui	pas de différence ss si taxane ou non sur % aménorrhée	non testé	à 5 ans pas de différence entre régime	non testé	NA	non évalué	NA
Résultats complémentaires		92% des patientes AMH pré CT< 0,7 ng/mL-> A à 1 an RR=1,83 p=0,05	à 52 S 15R+// 1 AMH >0,05	ROC : seuil AMH 0,71 Se 54% Sp92% discriminant A/R	AMH<3,8->A AMH>20,3->R ; entre les 2 intérêt discriminant de l'âge 38,6 ans Se98,2%Sp80%	ORF:RR+ ou E2>10 ng/mL 19 sérum patientes à 1 an : 1 seule AMH détectable	analyse multi variée 1 an âge OR 1,20 IC 1,10-1,33 p 0,0003 18M âge + AMH OR 0,41 IC 0,18-0,95 p= 0,04	

Tableau 9 :
Caractéristiques et résultats de principales études sur l'AMH marqueur de réserve ovarienne après chimiothérapie du cancer du sein

d. Concentration d'AMH au diagnostic

Du fait de ces différences de distribution de l'âge et de la diversité des méthodes de dosage de l'AMH, il est difficile de comparer directement les concentrations d'AMH mesurées dans ces études à celles retrouvées chez nos patientes.

Le test de Spearman pratiqué sur notre échantillon est significatif ($p<0,05$) mais retrouve une moins bonne corrélation que celles des études d'Anderson en 2013 (178) et 2006 (179) ($r=-0,36$ pour notre étude contre $r=-0,56$ et $r=-0,45$)). Néanmoins, toutes les études y compris la nôtre retrouvent au diagnostic des concentrations significativement plus élevées chez les patientes de moins de 35 ans comparées au plus âgées, témoin de la diminution physiologique de la réserve ovarienne liée à l'âge.

On peut toutefois remarquer que la différence entre les concentrations pré-thérapeutiques d'AMH dans les groupes d'âge semble plus marquée dans les études de nos confrères. En effet, notre étude retrouve chez les moins de 35 ans, une concentration moyenne d'AMH à 3,57 contre 2,40 ng/mL chez les plus de 35 ans. Le constat est le même avant exclusion des AMH<0,42 ng/mL et >7 ng/mL. Ceci est certainement le reflet du recrutement de patientes plus jeunes au diagnostic notamment pour le groupe dit « âgé » qui ne dépasse pas par définition les 40 ans.

e. Indétectabilité de la concentration d'AMH au cours de la chimiothérapie

Sous chimiothérapie, la plupart des patientes deviennent indétectables quelque soit la technique de dosage d'AMH utilisée.

L'évaluation de la concentration d'AMH dans la première étude d'Anderson en 2006 retrouve à 3 mois une AMH quasi indétectable pour l'ensemble des 42 patientes.

Dans l'étude de Yu (2010), les patientes toutes âgées de moins de 40 ans quelque soit leur concentration initiale d'AMH (médiane 0,86 min=0,07 max= 9,1 ng/mL) présentent dès 6 semaines après le début de leur chimiothérapie un effondrement de leur concentration d'AMH (médiane 0,08 ng/mL max= 0,21 ng/mL) ; à 12 semaines (équivalent P4P5) la concentration médiane d'AMH est de 0,05 ng /mL (180).

Une seule étude a évalué les concentrations d'AMH à 1 mois du début de la chimiothérapie (Anderson 2013) où elles passent d'une moyenne de 7,9 pmol/L+/- 1,3 à 3,5pmol/L+/- 0,7.

Dans notre étude, la proportion de patientes dosables au diagnostic avec une concentration d'AMH devenue inférieure à 0,42 ng/mL au décours de la chimiothérapie croît progressivement avec le nombre de cures :
-6,71% après la première cure
-40,65% après la deuxième cure
-56,8% après la troisième cure
-75,70% après la 4ème cure
-79,7% après la 5ème cure

Néanmoins, pour les faibles valeurs, notre méthode d'analyse, comme beaucoup de techniques ELISA, est caractérisée par un CV élevé de l'ordre de 20%. Pour intégrer cette imprécision à l'interprétation de résultats, un « seuil d'indétectabilité » a été fixé à 0,50 ng/mL et le moment d'indétectabilité calculé en nombre de cure à deux décimales au pro rata des valeurs d'AMH encadrant la cure.

Les effectifs de notre étude permettent de mettre en évidence une différence statistiquement significative entre les 2 classes d'âges : les femmes de plus de 35 ans deviennent indétectables aux environs de la deuxième cure de chimiothérapie contre la troisième cure pour les moins de 35 ans. Il n'est pas surprenant de voir les femmes plus âgées à taux d'AMH en moyenne plus bas au diagnostic atteindre plus rapidement ces seuils. Cette observation est cohérente avec les données des autres études qui cependant ne possédaient pas les effectifs nécessaires pour mettre en évidence la différence de cinétique de décroissance en fonction de l'âge et de la concentration initiale d'AMH.

f. Cinétique de décroissance de l'AMH per-chimiothérapie

- **Effet de la 1ère cure de chimiothérapie**

Cette étude est la première, à notre connaissance à décrire la cinétique de décroissance au cours d'un protocole unique de chimiothérapie sur un effectif conséquent. L'expression des concentrations d'AMH en % d'AMH initiale mesurable permet de s'affranchir de la valeur absolue initiale de l'AMH préthérapeutique et de la sensibilité fonctionnelle de la méthode de dosage.

Les premiers résultats de l'étude d'Anderson en 2013 montre une décroissance de la moyenne de la concentration d'AMH après la première cure de chimiothérapie d'environ 50 % sur 59 patientes. La variation de concentration d'AMH calculée dans notre étude est comparable, avec une moyenne à -49,21%. Malgré tout, l'écart type est large à 37,67% faisant suspecter l'existence de différents profils de décroissance éventuellement dépendants d'autres variables telles que la concentration d'AMH initiale ou l'âge au diagnostic.

En valeur absolue, les concentrations d'AMH à P2 soit après la première cure sont corrélées aux concentrations préthérapeutiques P0P1 ($r=0,77$ $p<0,001$) et à l'âge des patientes($r=-0,48$ $p<0,001$).

A cytotoxicité égale, on peut envisager qu'en partant d'un pool folliculaire antral plus important, la population folliculaire résiduelle après la première cure sécrète une quantité mesurable plus importante après une première cure de chimiothérapie. La concentration d'AMH préthérapeutique étant corrélée à l'âge, la concentration à P2 y reste corrélée.

Ce que l'on cherche à mettre en évidence en terme de cytotoxicité ovarienne des chimiothérapies correspond davantage à la capacité de l'ovaire à « résister » à l'attaque cytotoxique quelque soit la concentration initiale d'AMH**.**

En terme de décroissance, la variation liée la première cure exprimée en % d'AMH initiale mesurable (P0P2%) reste seulement corrélée à l'âge (r=-0,34 p<0,001) et non plus à la valeur absolue de la concentration d'AMH initiale (r=0,12 NS).

Ces résultats laissent envisager que l'âge de la patiente influence davantage la cinétique de décroissance que la concentration de l'AMH au diagnostic. Cette hypothèse est confortée par l'absence de différence significative démontrée entre les décroissances calculées après la première cure pour les 2 groupes d'AMH préthérapeutiques (<2 ng/mL et de 2 à 7 ng/mL).

A l'issue de la première cure de chimiothérapie, l'ovaire jeune possèderait les ressources physiologiques nécessaires à la survie ou à la régénéreration d' un pool de follicules antraux sécrétant de l'AMH contrairement à l'ovaire plus âgée.

- **Effet de la 2ème cure de chimiothérapie**

Après la deuxième cure de chimiothérapie, les concentrations d'AMH s'effondrent comme en témoignent la médiane à 0,53 ng/mL et la variation médiane cumulée à -94%. La différence de décroissance entre les 2 groupes d'âge reste statistiquement significative mais à seulement 10% d'écart (-78% et -88% de moyenne).

Si les variations observées entre 1ère et 2ème cure et celles observées à la première cure sont inversement corélées, cela signifie tout simplement que les patientes présentant dès l'issue de la première cure une diminution importante reste à un très faible niveau de concentration et que les patientes qui avaient présenté une diminution plus modérée de leur concentration d'AMH à l'issue de la première cure, vont finir par atteindre des taux faibles dit « indétectables » autour de 0,50 ng/mL proches de la sensibilité fonctionnelle de la technique.

La comparaison des décroissances cumulées après la deuxième cure en fonction de la classe d'AMH initiale reste statistiquement significative mais avec des moyennes similaires à -84 à -85%, les différences se portant sur les médianes (-100% pour les <2 ng/mL contre -89% pour les 2-7) et les ET (30% contre 17,21%). A ce point d'évaluation les faibles valeurs absolues des concentrations d'AMH s'approchent des valeurs de forte imprécision analytique, les différences statistiques ne sont pas biologiquement pertinentes de notre point de vue.

Par la suite, l'adjonction d'une troisième cure à base de cyclophosphamide et d'anthracycline achève d'effondrer les capacités de sécrétion d'AMH, phénomène qui sera entretenu pas les cures de taxanes qui suivront.

Quoiqu'il en soit, cette description de la décroissance met en évidence deux profils de vitesse de décroissance différente, qui semblent principalement dépendants de l'âge.

IV. Processus physiopathologique de l'atteinte de la réserve ovarienne sous chimiothérapie : hypothèses

Ce constat amène à se pencher sur la physiopathologie de l'atteinte folliculaire de l'ovaire sous chimiothérapie pour laquelle plusieurs mécanismes pourraient coexister (127,181) :

a. Atteinte directe des follicules en croissance

La diminution des concentrations sériques d'AMH de la femme dans les suites de l'introduction d'une chimiothérapie est un argument d'atteinte des follicules pré antraux et petit antraux. L'apoptose des cellules de la granulosa proliférantes et productrices d'AMH prive l'ovocyte de son soutien aboutissant à la dégénerescence du follicule concerné. La décroissance des concentrations d'AMH de femmes sous chimiothérapie est donc concordante avec les lésions des follicules antraux mises en évidence dans les modèles d'étude de la cytotoxicité ovarienne. La réserve folliculaire antrale sous chimiothérapie diminue.

b. Atteinte directe de follicules primordiaux

Du fait des mécanismes d'action décrits comme pouvant survenir à n'importe quel moment du cycle cellulaire, le cyclophosphamide et les anthracyclines pourraient toucher directement les follicules primaires quiescents induisant l'apoptose des cellules ovariennes ciblées suite au lésions directes de l'ADN ou à un éventuel stress oxydatif. La réserve de follicules primordiaux pourrait être directement touchée sous chimiothérapie et diminuerait.
Il a de plus été récemment démontré que le cyclophosphamide induit le recrutement basal par mise en jeu de la voie PI3K/PTEN/AKT(182). Cette activation des follicules primordiaux pourrait être directe ou consécutive à l'atteinte de la réserve antrale.

c. Déplétion indirecte des follicules primordiaux

De l'atteinte directe des follicules en croissance antrale résulte une diminution de la sécrétion d'agents paracrines inhibiteurs de l'activation des primordiaux qui conduit indirectement à une accélération du recrutement basal et donc à une déplétion du stock de follicules primordiaux. Cet effet se majore à chaque cycle de chimiothérapie correspondant à la théorie imagée du « burn-out » folliculaire.

L'atteinte séparée des 2 réserves folliculaires ovariennes est de plus potentiellement majorée ou entretenue par l'atteinte du stroma ovarien (153). La régulation des populations folliculaires repose sur un équilibre dynamique crée par l'environnement ovarien des follicules en croissance antrale exerçant un frein au recrutement basal. L'équilibre des populations folliculaires est perturbé et accentue l'atteinte de ces 2 réserves folliculaires.

V. AMH, réserve ovarienne et aménorrhée

a. Valeur informative de l'AMH sur l'atteinte de la réserve ovarienne pendant la chimiothérapie

Dans ces conditions, pendant la chimiothérapie, les concentrations d'AMH ne sont donc plus le reflet du pool folliculaire antral en équilibre avec la réserve primordiale. La sécrétion résiduelle d'AMH est le résultat de la somme de la destruction cytotoxique du tissu de la granulosa et des capacités de l'ovaire à recruter et à redonner un petit pool de follicules antraux sécrétant. En ce sens, les patientes qui présentent sur les 60 premiers jours de chimiothérapie une plus faible décroissance de l'AMH seraient celles qui sont capables malgré la destruction des follicules antraux de recruter des follicules dont une partie réussit à survivre et à sécréter de l'AMH.

Viennent en faveur de cette hypothèse l'analyse du statut menstruel déclaré à la dernière visite sous chimiothérapie par les patientes. En effet les 48 patientes (sur 132) qui rapportent des règles pendant la dernière cure de chimiothérapie n'ont pas présenté d'arrêt des menstruations sous chimiothérapie. Elles auraient donc conservé un petit pool de follicules capable d'assurer un dialogue hypothalamo hypophyso gonadique à l'origine de cycles se manifestant par des menstruations. Si ces patientes n'ont pas une concentration d'AMH initiale et de fin de chimiothérapie différentes de celles relatant l'absence de règles à la dernière cure, les taux de décroissance diffèrent significativement : ils sont de l'ordre de -30% pour ces patientes contre -57% pour celles ne présentant plus de règles. Ces patientes sont également plus jeunes.

Plus que la concentration d'AMH pré-thérapeutique, la vitesse de décroissance de la concentration d'AMH mesurable semble informative sur le comportement de l'ovaire sous chimiothérapie.

b. Statut menstruel pendant la chimiothérapie, aménorrhée chimio-induite et fonction ovarienne

Pendant la dernière cure de chimiothérapie, 63,6% des patientes n'ont pas présenté de règles. Au cours des cures précédentes, aucune n'a conservé de cycles réguliers, avec parfois un arrêt de plus de 3 mois consécutifs, témoin de la dysfonction ovarienne chimio-induite, conséquence de l'atteinte de la réserve ovarienne.

Dans l'étude d'Anderson de 2006, 1 seule patiente a conservé des règles régulières pendant la chimiothérapie (n=42). Mais les patientes de cette étude étaient en moyenne plus âgées au diagnostic (41 ans ; 28-52). Cette étude est la seule à avoir évalué le statut menstruel 6 mois après le début de la chimiothérapie : toutes les patientes connaissent une irrégularité menstruelle et 55 % sont déclarées aménorrhéiques pour un âge moyen au diagnostic de 44,4 +/- 0,9 ans statistiquement différent de l'âge des femmes conservant des règles irrégulières (36,7 + /- 1,2 ans). Ces 2 groupes présentaient également des concentrations d'AMH

au diagnostic statistiquement différentes (0,58+/- 0,14 ng/mL versus 1,9+ /-0,4 ng/mL) certainement lié à l'âge.

Pendant l'administration du traitement, la destruction des follicules en croissance peut occasionner une oligo-aménorrhée voire une aménorrhée : les cellules de la thèque et de la granulosa de ces follicules en croissance sont lésées par les agents cytotoxiques. L'ovaire est incapable de sécréter les oestrogènes nécessaires au dialogue hypothalamo hypophyso gonadique et à la stimulation cyclique de la croissance de l'endomètre : les menstruations disparaissent. Cette aménorrhée sera résolutive après traitement si un contingent suffisant de follicules de la réserve de primordiaux a subsisté à la chimiothérapie. En se basant sur l'estimation du laps de temps nécessaire au développement folliculaire de l'activation primordiale au recrutement possible par la FSH (180 à 200 jours), le retour de règles devrait survenir environ 6 mois après la chimiothérapie en l'absence de tout autre traitement perturbant la fonction ovarienne.

Si la dépletion chimio-induite en follicules primordiaux est totale (atteinte du seuil de 1000 follicules primordiaux residuels caractérisant les femmes ménopausées), la patiente présente une insuffisance ovarienne vraie sans retour de règles (183). Il s'agit d'un hypogonadisme hypergonadotrope caractérisé par une augmentation de la FSH (> 20 UI/L voire à 40 UI/L avec élévation de la la LH et hypo-oestrogénie).

Selon l'importance de la déplétion, le fonction ovarienne peut reprendre mais reste à savoir pour combien de temps : la période de fécondité potentielle est ainsi réduite d'autant plus que peut se surajouter un traitement de type tamoxifène pour une durée théorique de 5 ans, retardant tout projet de grossesse.

Sur un suivi à long terme, il est envisageable que les patientes pourront présenter une insuffisance ovarienne prématurée voire une ménopause précoce si on applique les critères diagnostiques de l'OMS. L'OMS considère en effet l'insuffisance ovarienne comme prématurée si elle survient avant 40 ans, âge situé à 2 déviations standard de l'âge moyen de la ménopause habituellement constaté (51 ans dans les pays dits développés). Cet âge de 40 ans les distingue des ménopauses précoces définies par l'arrêt des règles de plus de 6 mois consécutifs avant 45 ans (184).

Cette approche est par ailleurs focalisée sur l'aspect quantitatif de l'état de la réserve basé sur le retour des règles. Même en cas de réapparition de ces dernières témoignant d'une réserve ovarienne résiduelle, la qualité ovocytaire potentiellement altérée par la chimiothérapie pourrait être à l'origine d'une fertilité diminuée. De plus peuvent se surajouter les complications de la carence en oestrogènes (cardiovasculaires, ostéoporotique, sexuelles et psychologiques)(185).

c. Synthèse de la littérature sur les relations entre AMH et aménorrhée post chimiothérapie après cancer du sein

La plupart des études sur les relations entre AMH, réserve ovarienne et aménorrhée ont évalué le statut menstruel à un moment fixe après la chimiothérapie.

- A 1 an du diagnostic

3 études ont établi le statut menstruel de leurs patientes : les proportions observées de femmes en aménorrhée sont de 81,8 et de 82,3% pour 2 d'entre elles sachant que l'âge moyen de ces femmes au diagnostic dépassait 40 ans (Ruddy 2014 n=125; Anderson 2013 n=59)(178,186). Ces 2 études mettent en évidence une différence statistiquement significative de l'âge et de l'AMH au diagnostic ; les patientes en aménorrhée post-chimiothérapie sont plus âgées (>43 ans) et présentent une concentration d'AMH initiale plus faible (variables déjà corrélée au diagnostic). Dans la 3ème étude (Yu 2010) où l'âge inférieur à 40 ans faisait partie des critères d'inclusion : la proportion de femmes en aménorrhée à 1 an y est plus faible de l'ordre de 42% (n =11/26) avec une différence marquée entre les plus et les moins de 35 ans : 50% d'aménorrhée versus 25% (180). Il n'a pas été mis en évidence de différence significative de concentration d'AMH initiale entre les groupes aménorrhée / non aménorrhée.

- A 18 mois après le diagnostic

La proportion de femmes de l'étude de Lynn Henry en aménorrhée n'est que de 36,4% (n=8/22 évaluables à 1 an) en sachant que la sélection est critiquable : les patientes ont été recrutées au hasard au sein d'une étude prospective pour constituer 4 groupes d'âge d'effectif équivalent (total de 28 patientes) et que l'âge des patientes perdues de vue n'est pas mentionné (187). A 18 mois du diagnostic également, l'étude d'Anders évalue 21 patientes sur 44 initialement : 76,2% de ces patientes sont en aménorrhée : elles sont en moyenne plus âgées que les patientes avec retour de règle (44 ans versus 40 ans) et présentaient au diagnostic une concentration d'AMH significativement plus faible (0,16 ng/mL versus 1,09) (188). La troisième étude évaluant ses patientes à 18 mois du diagnostic est celle de Ruddy 2014 qui retrouvent une proportion d'aménorrhée inchangée depuis l'évaluation à 12 mois avec les mêmes différences entre les groupes avec l'âge et l'AMH préthérapeutique.

- A 2 ans du diagnostic,

Anderson en 2013 constate toujours 76,9% de patientes en aménorrhée, chiffre légèrement inférieur à l'évaluation à 1 an mais calculé sur un nombre inférieur de patientes (55 versus 39). De la même façon, l'âge et la concentration d'AMH au diagnostic diffèrent significativement entre les groupes aménorrhée et non aménorrhée (43,9 versus 37,9 ans p=0,03 et 4,0 versus 17,2 pmol/L).

- A 5 ans du diagnostic

L'étude d'Anderson (2011) a pu suivre 33 de ses 42 patientes sous chimiothérapie et rapporte un maintien des règles pour 10 patientes et 3 retours de menstruations après aménorrrhée. Les autres patientes étaient à 5 ans réellement en aménorrhée (n=20) ou considérées comme telles (hystérectomie, ovariectomie ou récidive n=9).

La proportion de femmes en aménorrhée à 5 ans représente donc dans ces conditions 76% de la cohorte. Une régression logistique sur cette classification de la cohorte a comparé âge et AMH préthérapeutique : l'AMH y est affirmée comme meilleur facteur prédictif du retour des règles sur la base d'un OR à 13,0 p=0,02. Les résultats chiffrés pour l'âge ne sont pas publiés. Des courbes ROC ont été tracées permettant de calculer une AUC de 0,91 pour l'AMH prédictive de l'aménorrhée contre 0,84 pour l'âge sans comparaison statistique pour démontrer une différence significative. Un seuil de 0,7 ng/mL serait discriminant mais avec une sensibilité de 54% et une spécificité de 92%(189).

L'aménorrhée liée à la chimiothérapie des patientes de notre cohorte sera décrite dans les prochaines analyses de l'étude en tant que marqueur de fonction ovarienne à mettre en relation avec les concentrations d'AMH circulante pré thérapeutiques et post thérapeutiques et l'âge.

d. Aménorrhée, récidive et survie post chimiothérapie du cancer du sein

L'aménorrhée après chimiothérapie (CRA) a été depuis longtemps étudiée dans le cadre de la surveillance des effets secondaires des protocoles de traitements des essais cliniques afin de déterminer sa prévalence, ses facteurs prédictifs et son influence sur la survie des patientes. L'aménorrhée est le témoin d'une carence en oestrogènes considérée protectrice vis à vis de la récidive de ce cancer hormono-dépendant (190).

L'âge est connu pour être un facteur prédictif fort de l'aménorrhée post chimiothérapie. Ceci a été évoqué dans les premières revues de la littérature (191). Malgré des définitions variables de la CRA selon les études, à régime de chimiothérapie égal, la prévalence de la CRA est plus faible chez les femmes de moins de 40 ans. Tout régime confondu 10 à 71% de ces femmes présentent une aménorrhée chimio-induite contre 49 à 100% des plus de 40 ans.

La nature des agents cytotoxiques utilisés, la combinaison ou la séquence choisie, les doses cumulées (notamment pour les alkylants et les anthracyclines), la durée de la chimiothérapie sont aussi des facteurs de variation majeurs de l'incidence de l'aménorrhée chimio-induite (192,193). La phase du cycle menstruel à laquelle la chimothérapie est débutée pourrait également moduler l'incidence de l'aménorrhée plus fréquente en cas d'administration en phase folliculaire(194).

En considérant les agents cytotoxiques séparément sans tenir compte de leur usage combiné en pratique, la plupart des études s'accordent pour reconnaître le cyclophosphamide comme l'agent alkylant le plus gonadotoxique en terme de risque d'aménorrhée chimio induite (risque > 80%). De plus, il existerait des susceptibilités variables aux effets toxiques, génétiquement déterminées. Par exemple, le variant 1B du cytochrome CYP3A4 métabolisant le cylophosphamide est associé à un risque augmenté d'insuffisance ovarienne chimio induite (195). Les anthracyclines et les taxanes seraient de risque intermédiaires et le 5 fluoro uracile de faible risque.

Risque d'aménorrhée permanente	molécule de chimiothérapie	schéma combiné de chimiothérapie
ELEVE (>80%)	cyclophosphamide	6 FEC, FAC, CMF chez les >40 ans
	ifosfamide	
	chlorambucil	
	melphalan	
	busulfan	
	procarbazine	
intermédiaire	cisplatine	6 FEC, FAC, CMF chez les 30-39 ans
	carboplatine	4 AC, EC chez les > 40 ans
	adriamycine	
	taxanes	
FAIBLE (<20%)	bléomycine	6 CMF, FEC ,FAC chez les <30 ans
	dactinomycine	4 AC, EC chez les <40 ans
	vincristine	
	methotrexate	
	5 fluorouracile	
à déterminer	trastuzumab	
	bevacizumab	
	lapatinib	

Tableau 10 : Estimation du risque d'aménorrhée permanente après chimiothérapie selon les molécules et les régimes administrés (d'après (196)).

L'impact des régimes de chimiothérapie a été étudié avec une méthodologie rigoureuse dans la récente méta-analyse de Zhao (197). Cette dernière regroupe 15916 patientes préménopausées au diagnostic (32 à 52 ans) de 33 études prospectives et 13 rétrospectives réalisées entre janvier 1990 et octobre 2013 d'un âge moyen de 32 à 52 ans avec une incidence de l'aménorrhée chimio induite de 15 à 94% selon les études.
Les auteurs ont démontré que l'incidence de l'amenorrhée chimio induite est statistiquement augmentée dans les schémas de chimiothérapie comprenant du cyclophosphamide (OR 2.25), des taxanes (OR 1.24) et l'utilisation combinée d'anthracycline taxanes et cyclophosphamide (OR 1.31). De même, le tamoxifène augmente le risque relatif d'aménorrhée chimio-induite chez les patientes préménopausées (OR 1.48)
De plus, l'aménorrhée chimio induite conditionne la survie sans progression ainsi que la survie prolongée (OR 1.17 et 1.15). Néanmoins, seuls les cancers exprimant les récepteurs hormonaux présentent une survie sans progression plus longue en cas d'amenorrhée chimio induite (OR 0.61).

CONCLUSION et PERSPECTIVES

La prédiction des effets de la chimiothérapie du cancer du sein sur la réserve ovarienne est une attente des patientes et des médecins pour le choix des modalités de préservation de la fertilité. Aujourd'hui, au diagnostic, avant l'introduction des traitements anti-cancéreux, toute patiente en âge de procréer devrait être reçue en urgence en consultation spécialisée en médecine de la reproduction (198). L'organisation de la prise en charge thérapeutique du cancer, quant elle comprend une chirurgie préalable à la chimiothérapie, peut laisser le temps de réaliser une stimulation ovarienne dans le but de conserver des ovocytes ou des embryons utilisables à distance de la chimiothérapie et de l'hormonothérapie. Le traitement du cancer est long, et sans même prendre en compte l'impact de la chimiothérapie, retarde les projets de grossesse de plusieurs années. Chez les patientes traitées par chimiothérapie, quelle que soit la tumeur primitive, la probabilité d'une fertilité post thérapeutique est trop faible pour prendre le risque de ne pas conserver des gamètes. De plus, malgré les données épidémiologiques rassurantes quant à l'incidence des malformations congénitales des naissances obtenues après cancer pédiatrique, l'absence totale de mutations germinales ou d'abberations chromosomiques liées aux agents cytotoxiques ne peut être garantie.

Néanmoins, l'hormonodépendance fréquente du cancer du sein pose question quant à l'innocuité des protocoles classiques de stimulation ovarienne, d'où l'évaluation clinique actuelle de schémas à base de GnRH, d'inhibiteurs de l'aromatase ou de tamoxifène. Des alternatives à la stimulation à type de cryopréservation de tissu ovarien ou de maturation ovocytaire in vitro sont également en développement. De même la participation de l'hyper-oestrogénie gravidique à la récidive doit être envisagée.

Afin de peser les bénéfices et les risques des stratégies possibles pour préserver la fertilité dans le contexte du cancer du sein, des études de recherche clinique doivent être menées pour évaluer l'impact de la chimiothérapie sur la réserve ovarienne de la femme. L'étude RESOVA démontre le lien entre âge et cinétique de déroissance de l'AMH faisant de cette hormone un marqueur de la diminution du pool fooliculaire antral au début de la chimiothérapie. Dès deux cures de chimiothérapie, l'AMH perd sa proportionnalité à la réserve de follicules primordiaux. L'AMH se révèle aussi être un acteur de l'inhibition du « burn-out » folliculaire chimio induit. Cette cinétique de décroissance de l'AMH témoigne de la capacité de l'ovaire jeune à résister initialement à la destruction folliculaire.

L'analyse des données du suivi jusqu'à 18 mois aura pour objectif d'évaluer si cette hypothèse se confirme à plus long terme par le retour d'une fonction ovarienne attestée par la présence de règles et la réémergence d'un pool de follicules antraux sécrétant de l'AMH à partir d'une réserve suffisante en follicules primordiaux. Des différences dans l'évolution des concentrations d'AMH seront également recherchées pour évaluer la variabilité éventuelle de l'impact sur la réserve ovarienne de doses cumulées et de protocoles de chimiothérapie différents. Des modèles de régression logistique seront également nécessaires pour évaluer la part de responsabilité de ces différents facteurs.

De nombreuses études décrivent la survenue de l'insuffisance ovarienne consécutive aux déplétions folliculaires chimio induites (155). Les patientes en aménorrhée prolongée présentent toutes une AMH sérique effondrée. Cependant le retour des règles n'est malheureusement pas forcément synonyme de fertilité recouvrée et, peut survenir même en présence de faibles concentrations d'AMH post-chimiothérapeutiques. La durée de l'aménorrhée chimio induite a déjà été associée à une plus forte probabilité de survenue de ménopause précoce. Les relations entre AMH et fonction ovarienne après chimiothérapie ne sont pas univoques. Même en situation physiologique, chez les femmes en bonne santé, si le taux d'AMH est prédictif de l'issue des stimulations ovariennes en assistance médicale à la procréation, une faible concentration en situation non médicalisée ne préjuge pas d'une diminution de fertilité et encore moins d'infertilité (199). Les études sur ce sujet sont par ailleurs controversées (200). Au-delà de la réserve ovarienne, la signification de l'AMH après chimiothérapie reste à déterminer quant à la fertilité de ces patientes. L'étude de l'AMH et des menstruations post chimiothérapeutiques devront se poursuivre à plus long terme encore par un suivi des taux de grossesse spontanées et obtenues avec prise en charge en AMP chez ces femmes en rémission d'un cancer du sein.

En attendant la confirmation de l'innocuité et de l'efficacité des traitements ovoprotecteurs en développement (181), cette étude conforte, par une mesure certes indirecte mais réalisée in vivo, l'âge des patientes comme déterminant majeur de la cytotoxicité de la chimiothérapie des femmes jeunes atteintes de cancer du sein.

BIBLIOGRAPHIE

1. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev. 2000 Apr;21(2):200–14.

2. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. Endocr Rev. 2009 Aug;30(5):465–93.

3. Hartshorne GM, Lyrakou S, Hamoda H, Oloto E, Ghafari F. Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: what are the criteria for oocyte selection? Mol Hum Reprod. 2009 Dec;15(12):805–19.

4. Fréour T, Barrière P. Le mythe de la réserve ovarienne. Mise à jour en Gynécologie Médicale. Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français; 2008.

5. Kerr JB, Myers M, Anderson RA. The dynamics of the primordial follicle reserve. Reproduction. 2013 Dec 1;146(6):R205–15.

6. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature. 2004 Mar 11;428(6979):145–50.

7. Celik O, Celik E, Turkcuoglu I, Yilmaz E, Simsek Y, Tiras B. Germline cells in ovarian surface epithelium of mammalians: a promising notion. Reprod Biol Endocrinol RBE. 2012;10:112.

8. Tingen C, Kim A, Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. Mol Hum Reprod. 2009 Dec 1;15(12):795–803.

9. Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, et al. The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles: What Is the Link? Biol Reprod. 2014 Mar 5;biolreprod.113.117077.

10. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. Hum Reprod Oxf Engl. 1986 Feb;1(2):81–7.

11. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. Endocr Rev. 2009 Oct;30(6):624–712.

12. Thibault C, Levasseur M-C, editors. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris, France: INRA : Ellipses; 2001. 928 p.

13. Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA, Albertini DF. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. Dev Biol. 2000 Oct 15;226(2):167–79.

14. Young JM, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. Reprod Camb Engl. 2010 Oct;140(4):489–504.

15. Greenfeld CR, Babus JK, Furth PA, Marion S, Hoyer PB, Flaws JA. BAX is involved in regulating follicular growth, but is dispensable for follicle atresia in adult mouse ovaries. Reprod Camb Engl. 2007 Jan;133(1):107–16.

16. Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. J Ovarian Res. 2009;2(1):9.

17. Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG, Jayaprakasan K, et al. 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 Aug;19(8):519–27.

18. Bentzen JG, Forman JL, Johannsen TH, Pinborg A, Larsen EC, Andersen AN. Ovarian antral follicle subclasses and anti-mullerian hormone during normal reproductive aging. J Clin Endocrinol Metab. 2013 Apr;98(4):1602–11.

19. Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. Trends Endocrinol Metab TEM. 2010 Feb;21(2):96–103.

20. Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. Endocr Rev. 2009 Aug;30(5):438–64.

21. Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier A-C, et al. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. Dev Camb Engl. 2004 Feb;131(4):933–42.

22. Monget P, Bobe J, Gougeon A, Fabre S, Monniaux D, Dalbies-Tran R. The ovarian reserve in mammals: a functional and evolutionary perspective. Mol Cell Endocrinol. 2012 Jun 5;356(1-2):2–12.

23. John GB, Shidler MJ, Besmer P, Castrillon DH. Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. Dev Biol. 2009 Jul 15;331(2):292–9.

24. Wood MA, Rajkovic A. Genomic markers of ovarian reserve. Semin Reprod Med. 2013 Nov;31(6):399–415.

25. Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. The primordial to primary follicle transition. Mol Cell Endocrinol. 2000 May 25;163(1-2):53–60.

26. Pangas SA. Regulation of the ovarian reserve by members of the transforming growth factor beta family. Mol Reprod Dev. 2012 Oct;79(10):666–79.

27. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. Reprod Camb Engl. 2006 Aug;132(2):191–206.

28. Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. Biol Reprod. 2001 Oct;65(4):994–9.

29. Nilsson EE, Skinner MK. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. Biol Reprod. 2003 Oct;69(4):1265–72.

30. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. Endocrinology. 1999 Dec;140(12):5789–96.

31. Tapanainen JS, Vaskivuo T, Aittomäki K, Huhtaniemi IT. Inactivating FSH receptor mutations and gonadal dysfunction. Mol Cell Endocrinol. 1998 Oct 25;145(1-2):129–35.

32. Hernández-Ochoa I, Gao L, Peretz J, Basavarajappa MS, Bunting SL, Karman BN, et al. Follicle-stimulating hormone responsiveness in antral follicles from aryl hydrocarbon receptor knockout mice. Reprod Biol Endocrinol RBE. 2013;11:26.

33. Allan CM, Wang Y, Jimenez M, Marshan B, Spaliviero J, Illingworth P, et al. Follicle-stimulating hormone increases primordial follicle reserve in mature female hypogonadal mice. J Endocrinol. 2006 Mar;188(3):549–57.

34. Gougeon A. La croissance folliculaire dans l'ovaire humain. Médecine Clin Endocrinol Diabète. 2011 mai-juin;52.

35. Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N, Craig LB. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. Fertil Steril. 2011 Jan;95(1):170–5.

36. Durlinger ALL, Visser JA, Themmen APN. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. Reprod Camb Engl. 2002 Nov;124(5):601–9.

37. Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarrás P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. Mol Cell Endocrinol. 2003 Dec 15;211(1-2):21–31.

38. Guerrier D, Boussin L, Mader S, Josso N, Kahn A, Picard JY. Expression of the gene for anti-Müllerian hormone. J Reprod Fertil. 1990 Mar;88(2):695–706.

39. Picard JY, Josso N. Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. Mol Cell Endocrinol. 1984 Jan;34(1):23–9.

40. Di Clemente N, Jamin SP, Lugovskoy A, Carmillo P, Ehrenfels C, Picard J-Y, et al. Processing of anti-mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-beta. Mol Endocrinol Baltim Md. 2010 Nov;24(11):2193–206.

41. Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N, Graem N, Müller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. J Clin Endocrinol Metab. 1999 Oct;84(10):3836–44.

42. Griesinger G, Dafopoulos K, Buendgen N, Cascorbi I, Georgoulias P, Zavos A, et al. Elimination half-life of anti-Müllerian hormone. J Clin Endocrinol Metab. 2012 Jun;97(6):2160–3.

43. Weenen C, Laven JSE, Von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. Mol Hum Reprod. 2004 Feb;10(2):77–83.

44. Andersen CY, Schmidt KT, Kristensen SG, Rosendahl M, Byskov AG, Ernst E. Concentrations of AMH and inhibin-B in relation to follicular diameter in normal human small antral follicles. Hum Reprod Oxf Engl. 2010 May;25(5):1282–7.

45. Visser JA, de Jong FH, Laven JSE, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. Reprod Camb Engl. 2006 Jan;131(1):1–9.

46. Grøndahl ML, Nielsen ME, Dal Canto MB, Fadini R, Rasmussen IA, Westergaard LG, et al. Anti-Müllerian hormone remains highly expressed in human cumulus cells during the final stages of folliculogenesis. Reprod Biomed Online. 2011 Apr;22(4):389–98.

47. Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. EMBO J. 2000 Apr 17;19(8):1745–54.

48. Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, de Winter JP, et al. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. Dev Camb Engl. 1994 Jan;120(1):189–97.

49. Vigier B, Forest MG, Eychenne B, Bézard J, Garrigou O, Robel P, et al. Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 May;86(10):3684–8.

50. Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, et al. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. Fertil Steril. 2011 Nov;96(5):1246–51.e1.

51. Hu R, Lou Y, Wang F-M, Ma H-M, Wu X, Zhang X-M, et al. Effects of recombinant human AMH on SCF expression in human granulosa cells. Cell Biochem Biophys. 2013;67(3):1481–5.

52. Sèdes L, Leclerc A, Moindjie H, Cate RL, Picard J-Y, di Clemente N, et al. Anti-Müllerian hormone recruits BMPR-IA in immature granulosa cells. PloS One. 2013;8(11):e81551.

53. Nilsson E, Rogers N, Skinner MK. Actions of anti-Mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. Reprod Camb Engl. 2007 Aug;134(2):209–21.

54. Visser JA, Durlinger ALL, Peters IJJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, et al. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous

cycle in anti-Müllerian hormone null mice. Endocrinology. 2007 May;148(5):2301–8.

55. Visser JA, Themmen APN. Role of anti-Müllerian hormone and bone morphogenetic proteins in the regulation of FSH sensitivity. Mol Cell Endocrinol. 2014 Jan 25;382(1):460–5.

56. Ogura-Nose S, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Hiroi H, Yano T, et al. Anti-Mullerian hormone (AMH) is induced by bone morphogenetic protein (BMP) cytokines in human granulosa cells. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2012 Sep;164(1):44–7.

57. Andersen CY, Byskov AG. Estradiol and regulation of anti-Müllerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. J Clin Endocrinol Metab. 2006 Oct;91(10):4064–9.

58. Grynberg M, Pierre A, Rey R, Leclerc A, Arouche N, Hesters L, et al. Differential regulation of ovarian anti-müllerian hormone (AMH) by estradiol through α- and β-estrogen receptors. J Clin Endocrinol Metab. 2012 Sep;97(9):E1649–57.

59. De Vet A, Laven JSE, de Jong FH, Themmen APN, Fauser BCJM. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. Fertil Steril. 2002 Feb;77(2):357–62.

60. La Marca A, Sighinolfi G, Giulini S, Traglia M, Argento C, Sala C, et al. Normal serum concentrations of anti-Müllerian hormone in women with regular menstrual cycles. Reprod Biomed Online. 2010 Oct;21(4):463–9.

61. Lie Fong S, Visser JA, Welt CK, de Rijke YB, Eijkemans MJC, Broekmans FJ, et al. Serum anti-müllerian hormone levels in healthy females: a nomogram ranging from infancy to adulthood. J Clin Endocrinol Metab. 2012 Dec;97(12):4650–5.

62. Kelsey TW, Wright P, Nelson SM, Anderson RA, Wallace WHB. A validated model of serum anti-müllerian hormone from conception to menopause. PloS One. 2011;6(7):e22024.

63. Broer SL, Eijkemans MJC, Scheffer GJ, van Rooij I a. J, de Vet A, Themmen APN, et al. Anti-mullerian hormone predicts menopause: a long-term follow-up study in normoovulatory women. J Clin Endocrinol Metab. 2011 Aug;96(8):2532–9.

64. Kelsey TW, Anderson RA, Wright P, Nelson SM, Wallace WHB. Data-driven assessment of the human ovarian reserve. Mol Hum Reprod. 2012 Feb;18(2):79–87.

65. Hehenkamp WJK, Looman CWN, Themmen APN, de Jong FH, Te Velde ER, Broekmans FJM. Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. J Clin Endocrinol Metab. 2006 Oct;91(10):4057–63.

66. Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy C, Englert Y. Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. Hum Reprod Oxf Engl. 2007 Jul;22(7):1837–40.

67. Van Disseldorp J, Lambalk CB, Kwee J, Looman CWN, Eijkemans MJC, Fauser BC, et al. Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-Mullerian hormone and antral follicle counts. Hum Reprod Oxf Engl. 2010 Jan;25(1):221–7.

68. Hadlow N, Longhurst K, McClements A, Natalwala J, Brown SJ, Matson PL. Variation in antimüllerian hormone concentration during the menstrual cycle may change the clinical classification of the ovarian response. Fertil Steril. 2013 May;99(6):1791–7.

69. Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, Kretschmer R, Birkhäuser MH. Statistically significant changes of antimüllerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women. Fertil Steril. 2008 Apr;89(4):927–33.

70. Sowers M, McConnell D, Gast K, Zheng H, Nan B, McCarthy JD, et al. Anti-Müllerian hormone and inhibin B variability during normal menstrual cycles. Fertil Steril. 2010 Sep;94(4):1482–6.

71. Schuh-Huerta SM, Johnson NA, Rosen MP, Sternfeld B, Cedars MI, Reijo Pera RA. Genetic variants and environmental factors associated with hormonal markers of ovarian reserve in Caucasian and African American women. Hum Reprod Oxf Engl. 2012 Feb;27(2):594–608.

72. Seifer DB, Golub ET, Lambert-Messerlian G, Benning L, Anastos K, Watts DH, et al. Variations in serum müllerian inhibiting substance between white, black, and Hispanic women. Fertil Steril. 2009 Nov;92(5):1674–8.

73. Bentzen JG, Forman JL, Pinborg A, Lidegaard Ø, Larsen EC, Friis-Hansen L, et al. Ovarian reserve parameters: a comparison between users and non-users of hormonal contraception. Reprod Biomed Online. 2012 Dec;25(6):612–9.

74. Dólleman M, Verschuren WMM, Eijkemans MJC, Dollé MET, Jansen EHJM, Broekmans FJM, et al. Reproductive and lifestyle determinants of anti-Müllerian hormone in a large population-based study. J Clin Endocrinol Metab. 2013 May;98(5):2106–15.

75. Nelson SM, Stewart F, Fleming R, Freeman DJ. Longitudinal assessment of antimüllerian hormone during pregnancy-relationship with maternal adiposity, insulin, and adiponectin. Fertil Steril. 2010 Mar 1;93(4):1356–8.

76. Köninger A, Kauth A, Schmidt B, Schmidt M, Yerlikaya G, Kasimir-Bauer S, et al. Anti-Mullerian-hormone levels during pregnancy and postpartum. Reprod Biol Endocrinol RBE. 2013;11:60.

77. Yarde F, Maas AHEM, Franx A, Eijkemans MJC, Drost JT, van Rijn BB, et al. Serum AMH levels in women with a history of preeclampsia suggest a role for

vascular factors in ovarian aging. J Clin Endocrinol Metab. 2014 Feb;99(2):579–86.

78. Plante BJ, Cooper GS, Baird DD, Steiner AZ. The impact of smoking on antimüllerian hormone levels in women aged 38 to 50 years. Menopause N Y N. 2010 Jun;17(3):571–6.

79. Freour T, Masson D, Dessolle L, Allaoua D, Dejoie T, Mirallie S, et al. Ovarian reserve and in vitro fertilization cycles outcome according to women smoking status and stimulation regimen. Arch Gynecol Obstet. 2012 Apr;285(4):1177–82.

80. Waylen AL, Jones GL, Ledger WL. Effect of cigarette smoking upon reproductive hormones in women of reproductive age: a retrospective analysis. Reprod Biomed Online. 2010 Jun;20(6):861–5.

81. La Marca A, Spada E, Grisendi V, Argento C, Papaleo E, Milani S, et al. Normal serum anti-Müllerian hormone levels in the general female population and the relationship with reproductive history. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2012 Aug;163(2):180–4.

82. Freeman EW, Gracia CR, Sammel MD, Lin H, Lim LC-L, Strauss JF. Association of anti-mullerian hormone levels with obesity in late reproductive-age women. Fertil Steril. 2007 Jan;87(1):101–6.

83. Steiner AZ, Stanczyk FZ, Patel S, Edelman A. Antimullerian hormone and obesity: insights in oral contraceptive users. Contraception. 2010 Mar;81(3):245–8.

84. Halawaty S, ElKattan E, Azab H, ElGhamry N, Al-Inany H. Effect of obesity on parameters of ovarian reserve in premenopausal women. J Obstet Gynaecol Can JOGC J Obstétrique Gynécologie Can JOGC. 2010 Jul;32(7):687–90.

85. Gatta G, van der Zwan JM, Casali PG, Siesling S, Dei Tos AP, Kunkler I, et al. Rare cancers are not so rare: the rare cancer burden in Europe. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 2011 Nov;47(17):2493–511.

86. Bouchardy C, Fioretta G, Verkooijen HM, Vlastos G, Schaefer P, Delaloye J-F, et al. Recent increase of breast cancer incidence among women under the age of forty. Br J Cancer. 2007 Jun 4;96(11):1743–6.

87. Narod SA. Breast cancer in young women. Nat Rev Clin Oncol. 2012 Aug;9(8):460–70.

88. Assi HA, Khoury KE, Dbouk H, Khalil LE, Mouhieddine TH, El Saghir NS. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. J Thorac Dis. 2013 Jun;5 Suppl 1:S2–8.

89. Cardoso F, Loibl S, Pagani O, Graziottin A, Panizza P, Martincich L, et al. The European Society of Breast Cancer Specialists recommendations for the management of young women with breast cancer. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 2012 Dec;48(18):3355–77.

90. Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Bossard N. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. InVS; 2013.

91. Independent UK Panel on Breast Cancer Screening. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. Lancet. 2012 Nov 17;380(9855):1778–86.

92. Paci E, Broeders M, Hofvind S, Puliti D, Duffy SW, EUROSCREEN Working Group. European breast cancer service screening outcomes: a first balance sheet of the benefits and harms. Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol. 2014 Jul;23(7):1159–63.

93. Yankaskas BC, Haneuse S, Kapp JM, Kerlikowske K, Geller B, Buist DSM, et al. Performance of first mammography examination in women younger than 40 years. J Natl Cancer Inst. 2010 May 19;102(10):692–701.

94. Samphao S, Wheeler AJ, Rafferty E, Michaelson JS, Specht MC, Gadd MA, et al. Diagnosis of breast cancer in women age 40 and younger: delays in diagnosis result from underuse of genetic testing and breast imaging. Am J Surg. 2009 Oct;198(4):538–43.

95. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO. 2013 Oct;24 Suppl 6:vi7–23.

96. Russo J, Russo IH. Development of the human breast. Maturitas. 2004 Sep 24;49(1):2–15.

97. Plu Bureau G, Touraine P, Kutten F. Sein et hormones. Encycl Med Chir. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier; 2002. p. 19.

98. Macias H, Hinck L. Mammary gland development. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2012 Aug;1(4):533–57.

99. Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. Nat Rev Cancer. 2003 Nov;3(11):832–44.

100. Joshi PA, Di Grappa MA, Khokha R. Active allies: hormones, stem cells and the niche in adult mammopoiesis. Trends Endocrinol Metab TEM. 2012 Jun;23(6):299–309.

101. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):3983–8.

102. Tanaka H, Nakamura M, Kameda C, Kubo M, Sato N, Kuroki S, et al. The Hedgehog signaling pathway plays an essential role in maintaining the CD44+CD24-/low subpopulation and the side population of breast cancer cells. Anticancer Res. 2009 Jun;29(6):2147–57.

103. Iqbal J, Chong PY, Tan PH. Breast cancer stem cells: an update. J Clin Pathol. 2013 Jun;66(6):485–90.

104. Badve S, Nakshatri H. Breast-cancer stem cells-beyond semantics. Lancet Oncol. 2012 Jan;13(1):e43–8.

105. Feinleib M. Breast cancer and artificial menopause: a cohort study. J Natl Cancer Inst. 1968 Aug;41(2):315–29.

106. Nichols HB, Visvanathan K, Newcomb PA, Hampton JM, Egan KM, Titus-Ernstoff L, et al. Bilateral oophorectomy in relation to risk of postmenopausal breast cancer: confounding by nonmalignant indications for surgery? Am J Epidemiol. 2011 May 15;173(10):1111–20.

107. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. N Engl J Med. 2001 Jan 25;344(4):276–85.

108. Bocchinfuso WP, Hively WP, Couse JF, Varmus HE, Korach KS. A mouse mammary tumor virus-Wnt-1 transgene induces mammary gland hyperplasia and tumorigenesis in mice lacking estrogen receptor-alpha. Cancer Res. 1999 Apr 15;59(8):1869–76.

109. Yue W, Yager JD, Wang J-P, Jupe ER, Santen RJ. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. Steroids. 2013 Feb;78(2):161–70.

110. Rebbeck TR, Kauff ND, Domchek SM. Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. J Natl Cancer Inst. 2009 Jan 21;101(2):80–7.

111. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. N Engl J Med. 2006 Jan 19;354(3):270–82.

112. Russo J, Fernandez SV, Russo PA, Fernbaugh R, Sheriff FS, Lareef HM, et al. 17-Beta-estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2006 Aug;20(10):1622–34.

113. Cavalieri EL, Rogan EG, Chakravarti D. Initiation of cancer and other diseases by catechol ortho-quinones: a unifying mechanism. Cell Mol Life Sci CMLS. 2002 Apr;59(4):665–81.

114. Gaikwad NW, Yang L, Pruthi S, Ingle JN, Sandhu N, Rogan EG, et al. Urine biomarkers of risk in the molecular etiology of breast cancer. Breast Cancer Basic Clin Res. 2009;3:1–8.

115. Ralph DA, Zhao LP, Aston CE, Manjeshwar S, Pugh TW, DeFreese DC, et al. Age-specific association of steroid hormone pathway gene polymorphisms with breast cancer risk. Cancer. 2007 May 15;109(10):1940–8.

116. Park SK, Yim D-S, Yoon K-S, Choi I-M, Choi J-Y, Yoo K-Y, et al. Combined effect of GSTM1, GSTT1, and COMT genotypes in individual breast cancer risk. Breast Cancer Res Treat. 2004 Nov;88(1):55–62.

117. AJCC. Breast Cancer Staging 7th Edition. https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/Documents/BreastLarge.pdf.

118. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. Br J Cancer. 1957 Sep;11(3):359–77.

119. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.

120. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO. 2013 Sep;24(9):2206–23.

121. Ferguson NL, Bell J, Heidel R, Lee S, Vanmeter S, Duncan L, et al. Prognostic value of breast cancer subtypes, Ki-67 proliferation index, age, and pathologic tumor characteristics on breast cancer survival in Caucasian women. Breast J. 2013 Feb;19(1):22–30.

122. Colleoni M, Rotmensz N, Robertson C, Orlando L, Viale G, Renne G, et al. Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO. 2002 Feb;13(2):273–9.

123. Morrison DH, Rahardja D, King E, Peng Y, Sarode VR. Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. Br J Cancer. 2012 Jul 10;107(2):382–7.

124. Engstrøm MJ, Opdahl S, Hagen AI, Romundstad PR, Akslen LA, Haugen OA, et al. Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat. 2013 Aug;140(3):463–73.

125. Gonçalves V, Sehovic I, Quinn G. Childbearing attitudes and decisions of young breast cancer survivors: a systematic review. Hum Reprod Update. 2014 Apr;20(2):279–92.

126. Senkus E, Gomez H, Dirix L, Jerusalem G, Murray E, Van Tienhoven G, et al. Attitudes of young patients with breast cancer toward fertility loss related to adjuvant systemic therapies. EORTC study 10002 BIG 3-98. Psychooncology. 2014 Feb;23(2):173–82.

127. Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? Hum Reprod Update. 2012 Oct;18(5):525–35.

128. Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. Rev Reprod. 1996 Sep;1(3):162–72.

129. Meirow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WHB. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. Clin Obstet Gynecol. 2010 Dec;53(4):727–39.

130. Desmeules P, Devine PJ. Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries. Toxicol Sci Off J Soc Toxicol. 2006 Apr;90(2):500–9.

131. Pourquier P. [Alkylating agents]. Bull Cancer (Paris). 2011 Nov;98(11):1237–51.

132. Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2012;920:613–26.

133. Petrillo SK, Desmeules P, Truong T-Q, Devine PJ. Detection of DNA damage in oocytes of small ovarian follicles following phosphoramide mustard exposures of cultured rodent ovaries in vitro. Toxicol Appl Pharmacol. 2011 Jun 1;253(2):94–102.

134. Sato M, Shiozawa K, Uesugi T, Hiromatsu R, Fukuda M, Kitaura K, et al. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 7) Effects of 2- or 4- week repeated dose studies and fertility study of cyclophosphamide in female rats. J Toxicol Sci. 2009;34 Suppl 1:SP83–9.

135. Tsai-Turton M, Luong BT, Tan Y, Luderer U. Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. Toxicol Sci Off J Soc Toxicol. 2007 Jul;98(1):216–30.

136. Oktem O, Oktay K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. Cancer Res. 2007 Nov 1;67(21):10159–62.

137. Rebbaa A, Zheng X, Chou PM, Mirkin BL. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. Oncogene. 2003 May 8;22(18):2805–11.

138. Morgan S, Lopes F, Gourley C, Anderson RA, Spears N. Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin. PloS One. 2013;8(7):e70117.

139. Bar-Joseph H, Ben-Aharon I, Rizel S, Stemmer SM, Tzabari M, Shalgi R. Doxorubicin-induced apoptosis in germinal vesicle (GV) oocytes. Reprod Toxicol Elmsford N. 2010 Dec;30(4):566–72.

140. Bonilla E, del Mazo J. Deregulation of gene expression in fetal oocytes exposed to doxorubicin. Biochem Pharmacol. 2003 May 15;65(10):1701–7.

141. Jurisicova A, Lee H-J, D'Estaing SG, Tilly J, Perez GI. Molecular requirements for doxorubicin-mediated death in murine oocytes. Cell Death Differ. 2006 Sep;13(9):1466–74.

142. Ben-Aharon I, Bar-Joseph H, Tzarfaty G, Kuchinsky L, Rizel S, Stemmer SM, et al. Doxorubicin-induced ovarian toxicity. Reprod Biol Endocrinol RBE. 2010;8: 20.

143. Roti Roti EC, Leisman SK, Abbott DH, Salih SM. Acute doxorubicin insult in the mouse ovary is cell- and follicle-type dependent. PloS One. 2012;7 (8):e42293.

144. Soleimani R, Heytens E, Darzynkiewicz Z, Oktay K. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. Aging. 2011 Aug;3(8):782–93.

145. Hrushesky WJ, Vyzula R, Wood PA. Fertility maintenance and 5-fluorouracil timing within the mammalian fertility cycle. Reprod Toxicol Elmsford N. 1999 Oct;13(5):413–20.

146. Gligorov J, Lotz JP. Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences. The Oncologist. 2004;9 Suppl 2:3–8.

147. Chen TT, Massey PJ, Caudle MR. The inhibitory action of taxol on granulosa cell steroidogenesis is reversible. Endocrinology. 1994 May;134 (5):2178–83.

148. Tarumi W, Suzuki N, Takahashi N, Kobayashi Y, Kiguchi K, Sato K, et al. Ovarian toxicity of paclitaxel and effect on fertility in the rat. J Obstet Gynaecol Res. 2009 Jun;35(3):414–20.

149. Ozcelik B, Turkyilmaz C, Ozgun MT, Serin IS, Batukan C, Ozdamar S, et al. Prevention of paclitaxel and cisplatin induced ovarian damage in rats by a gonadotropin-releasing hormone agonist. Fertil Steril. 2010 Mar 15;93 (5):1609–14.

150. Yucebilgin MS, Terek MC, Ozsaran A, Akercan F, Zekioglu O, Isik E, et al. Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: an animal model of premature ovarian failure and infertility. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2004 Feb;44(1):6–9.

151. Gücer F, Balkanli-Kaplan P, Doganay L, Yüce MA, Demiralay E, Sayin NC, et al. Effect of paclitaxel on primordial follicular reserve in mice. Fertil Steril. 2001 Sep;76(3):628–9.

152. Marcello MF, Nuciforo G, Romeo R, Di Dino G, Russo I, Russo A, et al. Structural and ultrastructural study of the ovary in childhood leukemia after successful treatment. Cancer. 1990 Nov 15;66(10):2099–104.

153. Meirow D, Dor J, Kaufman B, Shrim A, Rabinovici J, Schiff E, et al. Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. Hum Reprod Oxf Engl. 2007 Jun;22(6):1626–33.

154. Ben-Aharon I, Meizner I, Granot T, Uri S, Hasky N, Rizel S, et al. Chemotherapy-induced ovarian failure as a prototype for acute vascular toxicity. The Oncologist. 2012;17(11):1386–93.

155. Letourneau J, Chan SW, Rosen MP. Accelerating ovarian age: cancer treatment in the premenopausal woman. Semin Reprod Med. 2013 Nov;31(6):462–8.

156. Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, et al. Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. Hum Reprod Oxf Engl. 2011 Nov;26(11):3123–9.

157. Anders CK, Johnson R, Litton J, Phillips M, Bleyer A. Breast cancer before age 40 years. Semin Oncol. 2009 Jun;36(3):237–49.

158. Gnerlich JL, Deshpande AD, Jeffe DB, Sweet A, White N, Margenthaler JA. Elevated Breast Cancer Mortality in Young Women (<40 Years) Compared with Older Women Is Attributed to Poorer Survival in Early Stage Disease. J Am Coll Surg. 2009 Mar;208(3):341–7.

159. Wooster R, Weber BL. Breast and Ovarian Cancer. N Engl J Med. 2003 Jun 5;348(23):2339–47.

160. Ripperger T, Gadzicki D, Meindl A, Schlegelberger B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. Eur J Hum Genet. 2009 Jun;17(6):722–31.

161. Lalloo F, Varley J, Moran A, Ellis D, O'dair L, Pharoah P, et al. BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 2006 May;42(8):1143–50.

162. Jacquemier J, Charafe-Jauffret E, Houvenahegel G, Extra JM, Xerri L, Société française de sénologie et de pathologie mammaire F (Organiser of meeting). Does being young at the time of diagnosis define a subset of breast cancer? [Internet]. 2010. Available from: http://hdl.handle.net/2042/38714

163. Singh M, Ding Y, Zhang L-Y, Song D, Gong Y, Adams S, et al. Distinct breast cancer subtypes in women with early-onset disease across races. Am J Cancer Res. 2014;4(4):337–52.

164. Bachelot T, Bouzid K, Delozier T, Lortholary A, Petit T. État des lieux et mise à jour des traitements systémiques adjuvants. Oncologie. 2011 Oct 1;13(10-11):698–702.

165. Chauvet M-P, Debled M, Decanter C, Goncalves A, Largillier R, Pujol P, et al. Prise en charge du cancer du sein infiltrant de la femme âgée de 40 ans ou moins. Oncologie. 2011 Oct 1;13(10-11):703–26.

166. Schott AF, Hayes DF. Defining the benefits of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2012 May 20;30(15):1747–9.

167. Untch M, Konecny GE, Paepke S, von Minckwitz G. Current and future role of neoadjuvant therapy for breast cancer. The Breast [Internet]. [cited 2014 Aug 29]; Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960977614001143

168. Taieb J, Belville C, Coussieu C, Guibourdenche J, Picard J-Y, Di clemente N. [Two immunoassays for antimullerian hormone measurement: analytical and clinical performances]. Ann Biol Clin (Paris). 2008 Oct;66(5):537–47.

169. Fréour T, Mirallié S, Bach-Ngohou K, Denis M, Barrière P, Masson D. Measurement of serum anti-Müllerian hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA: comparison and relevance in assisted reproduction technology (ART). Clin Chim Acta Int J Clin Chem. 2007 Jan;375(1-2):162–4.

170. Rustamov O, Smith A, Roberts SA, Yates AP, Fitzgerald C, Krishnan M, et al. Anti-Mullerian hormone: poor assay reproducibility in a large cohort of subjects suggests sample instability. Hum Reprod Oxf Engl. 2012 Oct;27(10):3085–91.

171. Han X, McShane M, Sahertian R, White C, Ledger W. Pre-mixing serum samples with assay buffer is a prerequisite for reproducible anti-Mullerian hormone measurement using the Beckman Coulter Gen II assay. Hum Reprod Oxf Engl. 2014 May;29(5):1042–8.

172. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, et al. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. Hum Reprod Update. 2014 Jun;20(3):370–85.

173. Lukaszuk K, Ludwikowska B, Liss J, Kunicki M, Sawczak M, Lukaszuk A, et al. Decreasing Quality of the New Generations of Anti-Müllerian Hormone Assays. BioMed Res Int [Internet]. 2014 [cited 2014 Aug 31];2014. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3967630/

174. Lawrenz B, Fehm T, von Wolff M, Soekler M, Huebner S, Henes J, et al. Reduced pretreatment ovarian reserve in premenopausal female patients with Hodgkin lymphoma or non-Hodgkin-lymphoma--evaluation by using antimüllerian hormone and retrieved oocytes. Fertil Steril. 2012 Jul;98(1):141–4.

175. Su HI, Sammel MD, Homer MV, Bui K, Haunschild C, Stanczyk FZ. Comparability of antimüllerian hormone levels among commercially available immunoassays. Fertil Steril. 2014 Jun;101(6):1766–72.e1.

176. Iliodromiti S, Kelsey TW, Anderson RA, Nelson SM. Can anti-Mullerian hormone predict the diagnosis of polycystic ovary syndrome? A systematic review and meta-analysis of extracted data. J Clin Endocrinol Metab. 2013 Aug;98(8):3332–40.

177. Blondel B, Lelong N, Kermarrec M, Goffinet F, National Coordination Group of the National Perinatal Surveys. Trends in perinatal health in France from 1995 to 2010. Results from the French National Perinatal Surveys. J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod. 2012 Jun;41(4):e1–15.

178. Anderson RA, Rosendahl M, Kelsey TW, Cameron DA. Pretreatment anti-Müllerian hormone predicts for loss of ovarian function after chemotherapy for early breast cancer. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 2013 Nov;49(16):3404–11.

179. Anderson RA, Themmen APN, Al-Qahtani A, Groome NP, Cameron DA. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. Hum Reprod Oxf Engl. 2006 Oct;21(10):2583–92.

180. Yu B, Douglas N, Ferin MJ, Nakhuda GS, Crew K, Lobo RA, et al. Changes in markers of ovarian reserve and endocrine function in young women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy. Cancer. 2010 May 1;116(9):2099–105.

181. Roness H, Kalich-Philosoph L, Meirow D. Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: possible roles for hormonal and non-hormonal attenuating agents. Hum Reprod Update. 2014 Sep;20(5):759–74.

182. Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S, et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and “burnout”; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. Sci Transl Med. 2013 May 15;5(185):185ra62.

183. Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. Biol Reprod. 1994 Mar;50(3):653–63.

184. De Vos M, Devroey P, Fauser BCJM. Primary ovarian insufficiency. Lancet. 2010 Sep 11;376(9744):911–21.

185. Schover LR. Premature ovarian failure and its consequences: vasomotor symptoms, sexuality, and fertility. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2008 Feb 10;26(5):753–8.

186. Ruddy KJ, Gelber SI, Tamimi RM, Ginsburg ES, Schapira L, Come SE, et al. Prospective study of fertility concerns and preservation strategies in young women with breast cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2014 Apr 10;32(11):1151–6.

187. Henry NL, Xia R, Schott AF, McConnell D, Banerjee M, Hayes DF. Prediction of postchemotherapy ovarian function using markers of ovarian reserve. The Oncologist. 2014 Jan;19(1):68–74.

188. Anders C, Marcom PK, Peterson B, Gu L, Unruhe S, Welch R, et al. A pilot study of predictive markers of chemotherapy-related amenorrhea among premenopausal women with early stage breast cancer. Cancer Invest. 2008 May;26(3):286–95.

189. Anderson RA, Cameron DA. Pretreatment serum anti-müllerian hormone predicts long-term ovarian function and bone mass after chemotherapy for early breast cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2011 May;96(5):1336–43.

190. Swain SM, Jeong J-H, Geyer CE, Costantino JP, Pajon ER, Fehrenbacher L, et al. Longer therapy, iatrogenic amenorrhea, and survival in early breast cancer. N Engl J Med. 2010 Jun 3;362(22):2053–65.

191. Walshe JM, Denduluri N, Swain SM. Amenorrhea in premenopausal women after adjuvant chemotherapy for breast cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2006 Dec 20;24(36):5769–79.

192. Ganz PA, Land SR, Geyer CE, Cecchini RS, Costantino JP, Pajon ER, et al. Menstrual history and quality-of-life outcomes in women with node-positive breast cancer treated with adjuvant therapy on the NSABP B-30 trial. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2011 Mar 20;29(9):1110–6.

193. Sukumvanich P, Case LD, Van Zee K, Singletary SE, Paskett ED, Petrek JA, et al. Incidence and time course of bleeding after long-term amenorrhea after breast cancer treatment: a prospective study. Cancer. 2010 Jul 1;116(13):3102–11.

194. Di Cosimo S, Alimonti A, Ferretti G, Sperduti I, Carlini P, Papaldo P, et al. Incidence of chemotherapy-induced amenorrhea depending on the timing of treatment by menstrual cycle phase in women with early breast cancer. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO. 2004 Jul;15(7):1065–71.

195. Su HI, Sammel MD, Velders L, Horn M, Stankiewicz C, Matro J, et al. Association of cyclophosphamide drug-metabolizing enzyme polymorphisms and chemotherapy-related ovarian failure in breast cancer survivors. Fertil Steril. 2010 Jul;94(2):645–54.

196. Torino F, Barnabei A, De Vecchis L, Sini V, Schittulli F, Marchetti P, et al. Chemotherapy-induced ovarian toxicity in patients affected by endocrine-responsive early breast cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2014 Jan;89(1):27–42.

197. Zhao J, Liu J, Chen K, Li S, Wang Y, Yang Y, et al. What lies behind chemotherapy-induced amenorrhea for breast cancer patients: a meta-analysis. Breast Cancer Res Treat. 2014 May;145(1):113–28.

198. Agence de Biomédecine, InCA. Conséquences des traitements des cancers et préservation de la fertilité. Etats des connaissances. 2012 Dec.

199. Hagen CP, Vestergaard S, Juul A, Skakkebæk NE, Andersson A-M, Main KM, et al. Low concentration of circulating antimüllerian hormone is not predictive of reduced fecundability in young healthy women: a prospective cohort study. Fertil Steril. 2012 Dec;98(6):1602–8.e2.

200. Steiner AZ, Herring AH, Kesner JS, Meadows JW, Stanczyk FZ, Hoberman S, et al. Antimüllerian hormone as a predictor of natural fecundability in women aged 30-42 years. Obstet Gynecol. 2011 Apr;117(4):798–804.

Vu, le Président du Jury,

Pr. Paul Barrière

Vu, le Directeur de Thèse,

Pr. Damien Masson

Vu, le Doyen de la Faculté,

Pr. Pascale Jolliet

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

Année de la soutenance
2014

Nom-Prénom : GALLAIS UMBERT Anaïs

Titre du mémoire – thèse :

SUIVI DE L'HORMONE ANTI-MÜLLERIENNE (AMH), MARQUEUR DE RÉSERVE OVARIENNE CHEZ DES FEMMES DE MOINS DE 40 ANS TRAITÉES PAR CHIMIOTHÉRAPIE POUR CANCER DU SEIN
ÉTUDE RESOVA

Résumé

La chimiothérapie du cancer du sein affecte la réserve ovarienne des femmes en âge de procréer. L'hormone anti mullerienne (AMH) synthétisée par la granulosa des follicules antraux est un acteur important de la régulation paracrine de cette réserve. Sa concentration sérique permet une estimation indirecte du nombre de follicules primordiaux.

L'objectif de cette étude consiste en la description de la cinétique de décroissance de l'AMH au cours de la chimiothérapie du cancer du sein de patientes âgées de moins de 40 ans et en la mise en évidence de ses déterminants. L'étude multicentrique et observationnelle a porté après exclusion des suspicions d'IOP et de SOPK sur 134 patientes de la cohorte du PHRC RESOVA, traitées par 3 FEC suivi de 3 Taxotère®.

Avant la dernière cure, 98% des patientes ont une concentration d'AMH inférieure à 1 ng/mL. La décroissance moyenne après 2 cures de FEC correspond à 84% de la concentration d'AMH initiale. La décroissance liée à la première cure est corrélée à l'âge et non à la concentration pré-thérapeutique en AMH. L'âge et la décroissance liée à la première cure des patientes présentant des règles durant toute la chimiothérapie (34,2 ans;-33,6%) sont statistiquement différents de ceux des patientes en irrégularité menstruelle ou sans règles (36,8 ans ;-56,5%).

Cette étude met en évidence 2 profils de décroissance de l'AMH sous FEC liés à l'âge de l'ovaire. Ces résultats seront à confirmer par l'analyse des concentrations d'AMH et du calendrier précis des règles à 6, 12 et 18 mois de la fin du traitement.

MOTS-CLES : **AMH ; RESERVE OVARIENNE ; CHIMIOTHERAPIE ; CANCER DU SEIN**

JURY :

Président : M. Paul BARRIERE, Professeur de Médecine de la Reproduction
Faculté de médecine de Nantes

Assesseurs : M. Damien MASSON, Professeur de Biochimie
Faculté de médecine de Nantes
M. Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie
Faculté de Pharmacie de Nantes
M.Thomas FREOUR, MCU-PH Médecine de la Reproduction
Faculté de médecine de Nantes
M.Michaël GRYNBERG, Professeur de Médecine de la Reproduction
Faculté de médecine de Paris 13.