

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE**

ANNEE 2005

N°65

**MEMOIRE DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury interrégional

Le 24 Octobre 2005

Par Mr Thomas FREOUR

Conformément aux dispositions de l'arrêté

Du 23 Janvier 2003 tient lieu de

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

L'Hormone anti-Müllerienne :
comparaison de 2 trousse de dosage et
intérêt de son évaluation chez la femme en médecine de la reproduction.

Président : Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD
Membres : Monsieur le Professeur Paul BARRIERE
Madame le Docteur Sophie MIRALLIE
Monsieur le Docteur Damien MASSON (Directeur de thèse)

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	ERREUR ! SIGNET NON DÉFINI.
SOMMAIRE.....	2
TABLE DES FIGURES.....	4
LISTE DES TABLEAUX.....	5
INTRODUCTION.....	6
GENERALITES.....	8
INFERTILITE ET PRISE EN CHARGE D' UN COUPLE EN ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION.....	8
<u>I – L' INFERTILITE.....</u>	<u>9</u>
A - FACTEURS FÉMININS	10
B - FACTEURS MASCULINS	10
<u>II – PRISE EN CHARGE D' UN COUPLE EN ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION ...</u>	<u>12</u>
A – PROTOCOLES DE STIMULATION	12
1 - <i>Protocole long</i>	13
2 - <i>Protocole court</i>	14
3 - <i>Protocole antagoniste</i>	14
B – BIÂN HORMONAL DANS LA PRISE EN CHARGE D'UN CYCLE DE STIMULATION OVARIENNE	16
1 – <i>Le dosage de FSH</i>	16
2 – <i>Le dosage de l'oestradiol</i>	17
3 – <i>Le dosage de la LH</i>	17
4 – <i>Le dosage de l'inhibine B</i>	17
AMH STRUCTURE, EXPRESSION ET FONCTION	19
<u>I - ORGANISATION GÉNOMIQUE : GÈNE ET RÉGULATION DE L'EXPRESSION.....</u>	<u>20</u>
<u>II - STRUCTURE DE LA PROTÉINE.....</u>	<u>20</u>
<u>III - RÉCEPTEURS DE L'AMH.....</u>	<u>22</u>
A - AMHR1	22
B - AMHR2	22
<u>IV - VOIE DE SIGNALISATION.....</u>	<u>24</u>
<u>V - EXPRESSION DE L'AMH ET RÉGULATION</u>	<u>27</u>
A - CHEZ L'HOMME.....	27
B - CHEZ LA FEMME	28
VI - ACTIVITÉ PHYSIOLOGIQUE DE L'AMH.....	30
A – CHEZ LA FEMME	30
1 - <i>Généralités sur la folliculogénèse</i>	30
2 - <i>Rôle physiologique de l'AMH au niveau de l'ovaire</i>	31
B – CHEZ L'HOMME	32
1 - <i>Généralités sur la spermatogénèse</i>	32
2 - <i>Rôle physiologique au niveau testiculaire</i>	33
<u>VII – CIRCONSTANCES DE DOSAGE DE L'AMH.....</u>	<u>33</u>
A - CHEZ L'HOMME.....	33
B - CHEZ LA FEMME	34
1 - <i>Les tumeurs de la granulosa</i>	34
2 - <i>Evaluation de la réserve ovarienne</i>	36

OBJECTIFS DE L'ETUDE	37
PATIENTS, MATERIELS ET METHODES.....	39
<u>I – POPULATION DE PATIENTS</u>	40
<u>II – MATERIELS ET METHODES</u>	41
A - PRINCIPE DU DOSAGE	41
B - COMPARAISON DES KITS DE DOSAGE DSL [®] ET IMMUNOTECH [®]	42
<u>III – ANALYSE STATISTIQUE</u>	43
RESULTATS.....	44
<u>I – COMPARAISON DES DEUX TROUSSES.....</u>	45
<u>II – EVALUATION DU DOSAGE DE L'AMH DANS LE CADRE D'UNE STIMULATION OVARIENNE</u>	46
A - AMH ET CARACTERISTIQUES PHYSIQUES.....	47
1 - Etude de la corrélation de l'AMH sérique avec l'âge.....	47
2 - Etude de corrélation avec l'index de masse corporelle	48
B – CONCENTRATION CIRCULANTE EN AMH ET RÉPONSE OVARIENNE	50
1- Concentration en AMH et caractères de la stimulation ovarienne	50
2 - AMH sérique et résultat de la stimulation ovarienne.....	53
3 – AMH sérique et maturité ovocytaire.....	54
4 – FSH, oestradiol et réponse ovarienne	55
C – AMH SÉRIQUE ET ISSUE DE LA FIV	58
1 – AMH sérique et nombre d'embryons.....	58
2 – AMH sérique et taux de fécondation	59
3 – AMH sérique et qualité embryonnaire.....	60
4 – AMH sérique et grossesse.....	61
5 – AMH sérique et évolutivité de la grossesse	63
DISCUSSION	64
<u>I – ETUDE COMPARATIVE DES DEUX TROUSSES DE DOSAGE DE L'AMH.....</u>	65
<u>II – AMH SÉRIQUE ET REPONSE OVARIENNE.....</u>	68
<u>III – AMH ET ISSUE DE FECONDATION IN VITRO.....</u>	73
CONCLUSION	76
ANNEXE.....	79
LEXIQUE	81
BIBLIOGRAPHIE.....	82

Table des figures

Figure 1 - Structure schématique du gène codant pour l'AMH et localisation des principales altérations génétiques responsables du syndrome de persistance des canaux de Müller.

Figure 2 - Structure schématique de l'AMH et maturation de la protéine.

Figure 3 - Représentation tridimensionnelle du domaine C-terminal de l'AMH.

Figure 4 - Structure schématique du gène codant pour AMHR2 et répartition de ses principales altérations génétiques.

Figure 5 - Représentation schématique des voies de signalisation intracellulaires induites par l'AMH.

Figure 6 - Corrélation inverse de la testostérone et de l'AMH sériques chez l'homme.

Figure 7 - Evolution de la concentration sérique en AMH lors de la phase folliculaire d'une stimulation ovarienne contrôlée.

Figure 8 - Action régulatrice de l'AMH sur l'ovaire post-natal

Figure 9 - Concentrations sériques d'AMH chez des garçons avec une cryptorchidie bilatérale.

Figure 10 - Corrélation des résultats donnés par les deux trousse de dosage de l'AMH sérique.

Figures 11A et 11B - Répartition de la concentration de l'AMH sérique en fonction de l'âge des patientes.

Figures 12A et 12B - Répartition des concentrations sériques d'AMH en fonction du BMI

Figures 13A et B - Répartition de la concentration sérique d'AMH en fonction de la durée de stimulation.

Figures 14A et B - Répartition de la concentration sérique d'AMH en fonction du nombre d'unités de gonadotrophines consommées.

Figures 15A et B - Répartition de l'AMH sérique en fonction du nombre d'ovocytes ponctionnés.

Figure 16 - Répartition de la FSH et de l'oestradiol en fonction du nombre d'ovocytes.

Figure 17 - Répartition de l'AMH sérique et moyenne dans les 3 groupes en fonction de la réponse ovarienne.

Figures 18A et B - Répartition de l'AMH sérique en fonction du nombre total d'embryons obtenus.

Figures 19A et B - Répartition de l'AMH sérique en fonction de l'initiation ou non d'une grossesse.

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques de l'usage des différents protocoles de stimulation en 2001 et 2002

Tableau II : Bilan hormonal à J3 du cycle menstruel, pronostic de la réponse à une stimulation ovarienne et profil de la patiente.

Tableau III : Principaux gènes cibles et effets de l'AMH

Tableau IV : Concentration sérique physiologique d'AMH chez l'homme et la femme

Tableau V : Principales caractéristiques des 69 patientes suivies dans notre étude.

Tableau VI : Principales caractéristiques des deux kits de dosage de l'AMH.

Tableau VII : Résultats des dosages de l'AMH sérique chez les 69 femmes de notre population.

Tableau VIII : Caractéristiques des femmes enceintes et non enceintes à l'issue du cycle de FIV.

Tableau IX : Caractéristiques des patientes classées en 2 groupes selon leur réponse ovarienne.

Tableau X : Caractéristiques des patientes selon l'arrêt ou l'achèvement du cycle de stimulation.

Tableau XI : Principales caractéristiques des 69 patientes suivies dans notre étude.

INTRODUCTION

En France, plus d'un couple sur sept est concerné par l'infertilité, et plus de 60000 nouveaux couples consultent chaque année pour des difficultés à concevoir. Cette situation difficile nécessite une prise en charge spécialisée adaptée, qui commence par la recherche de facteurs d'infertilité et se poursuit par un bilan comprenant l'imagerie et la biologie. Le bilan hormonal a pour but d'évaluer le statut ovarien de la patiente afin d'adapter au mieux sa prise en charge en choisissant le meilleur protocole de stimulation ovarienne et en évaluant la nécessité d'une prise en charge rapide en assistance médicale à la procréation. Le bilan hormonal associe différents marqueurs, comme la FSH, l'oestradiol, la LH, l'inhibine B, mais aucun n'apporte d'information réellement fiable et précoce sur une éventuelle altération de la réserve ovarienne, et ne permet pas systématiquement de détecter des patientes à risque de mauvaise réponse ovarienne à la stimulation.

L'Hormone Anti-Müllérienne est un membre de la famille du TGF β sécrété exclusivement dans les gonades : les cellules de Sertoli dans les testicules, et les petits follicules antraux dans les ovaires. Ce pool ovarien de petits follicules antraux en croissance sécrétant l'AMH représente le stock de follicules primordiaux, qui correspond à la réserve ovarienne. Ainsi, la concentration de l'AMH sérique pourrait être liée à la réserve ovarienne, et donc à la capacité de réponse ovarienne à la stimulation. Récemment, plusieurs équipes ont étudié ce lien entre l'AMH et la réserve ovarienne et ont montré sa supériorité aux autres marqueurs habituellement utilisés. Le dosage de l'AMH, pour lequel il existe deux trousse de dosage commercialisées, pourrait donc présenter un intérêt en médecine de la reproduction.

L'objectif de notre travail est donc tout d'abord de déterminer les performances analytiques des deux trousse de dosage de l'AMH disponibles. Ensuite, l'étude prospective portant sur une population de 69 patientes suivies dans le service de Médecine de la Reproduction dans le cadre d'une fécondation *in vitro* permettra d'évaluer la valeur prédictive du dosage de l'AMH pour la réponse ovarienne à la stimulation d'une part, et pour l'issue de la stimulation avec l'initiation ou non d'une grossesse d'autre part. Enfin, l'ensemble des éléments cliniques et biologiques permettra de choisir la trousse de dosage de l'AMH la plus adaptée.

GENERALITES
INFERTILITE ET PRISE EN CHARGE D' UN COUPLE EN
ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION

I – L' INFERTILITE

Les problèmes de fertilité constituent une préoccupation majeure des couples. Des débuts de l'insémination au XVIII^{ème} siècle à la naissance de Louise Brown, premier enfant né d'une fécondation *in vitro*, en 1978, la médecine de la reproduction a constamment évolué pour tenter de remédier au mieux aux troubles de la fertilité. Un couple sans pathologie particulière, avec des rapports sexuels réguliers, possède environ 20% de chance par cycle de procréer. Ainsi, on considère que 85% environ des couples auront conçu après un délai de un an. Cependant, en France, l'infertilité concerne un couple sur sept, soit environ 60 000 nouveaux couples par an, ce qui représente 175 000 consultations spécialisées.

Il existe différents indicateurs permettant de qualifier et d'appréhender les différents aspects de l'infertilité. Tout d'abord la fécondité, qui est un état qui correspond au fait d'avoir eu un enfant vivant. Enfin, la fertilité, qui est une potentialité qui correspond à l'aptitude à concevoir. Un sujet qui n'a pas eu d'enfant vivant mais qui est susceptible d'en avoir est donc fertile et infécond. La stérilité ne correspond qu'à l'impossibilité absolue et définitive de concevoir, et n'est appréciable qu'après la fin de la période de reproduction du couple.

La fertilité peut se mesurer à l'aide d'indices. Tout d'abord le Délai Nécessaire à Concevoir (DNC) est le nombre de cycles au terme duquel la grossesse est obtenue. Il est de 4 cycles à 25 ans, et de 5 cycles tous âges confondus. Enfin, la fécondabilité qui est la probabilité de concevoir au bout d'un cycle, c'est-à-dire le pourcentage de grossesse par cycle exposé à la grossesse. Elle est de 25% à 25 ans, proche de 0% à 45 ans, et de 20% tous âges confondus.

L'infertilité touche le couple, et non pas un de ses membres isolément, et peut être due à différents éléments. On estime que dans 30% des cas, la cause est d'origine féminine, dans 20% des cas d'origine masculine, dans 40% d'origine mixte et dans 10% des cas d'origine indéterminée. Il existe de nombreux facteurs de risque d'infertilité qui concourent à l'altération de la fertilité.

A - Facteurs féminins

L'âge maternel est un paramètre important. La fertilité diminue avec l'âge pour devenir quasiment nulle après 45 ans. La proportion de fausses couches et d'anomalies génétiques augmente après 38 ans, âge où le taux de grossesses évolutives chute en fécondation *in vitro*. La réserve ovarienne est fortement liée à l'âge, et est estimée selon des critères échographiques et hormonaux. Une forte diminution de la réserve ovarienne, quel que soit l'âge de la patiente, équivaut à une situation pré-ménopausique très défavorable pour la fertilité. Viennent ensuite les causes infectieuses et leurs conséquences mécaniques. Ainsi, une infection pelvienne par *Chlamydia trachomatis* entraîne fréquemment une altération tubaire pouvant expliquer par la suite l'infertilité. D'autre part, les causes iatrogènes sont désormais bien caractérisées. L'exemple le plus frappant est la prise de Distilbène (DES) pendant la grossesse chez certaines femmes enceintes pendant les années 60-70 qui a entraîné des anomalies au niveau du col, de l'utérus et des trompes chez les filles, avec une diminution de la fertilité. Ces patientes atteintes de « DES syndrome » sont actuellement en âge de procréer et vont continuer à avoir recours aux techniques de procréation médicale assistée pendant quelques années. Enfin, le tabac constitue un élément péjoratif, il diminue la quantité et la qualité des ovocytes recueillis, et augmente la proportion d'ovocytes diploïdes.

B - Facteurs masculins

Chez l'homme, l'existence d'antécédents médicaux au niveau uro-génital doit faire craindre une altération du sperme. Une cryptorchidie, une torsion ou un traumatisme testiculaire peuvent en effet entraîner une azoospermie sécrétoire. De même, l'existence d'une varicocèle peut diminuer le pouvoir fécondant. De plus, les maladies sexuellement transmissibles peuvent, comme chez la femme, diminuer la fertilité de l'individu. D'autre part, de nombreux toxiques agissent sur la spermatogénèse, comme certains médicaments (chimiothérapies, antifoliques ...), l'alcool, les drogues, l'exposition à la radioactivité, l'exposition professionnelle au plomb, aux pesticides et aux solvants. Enfin, certaines professions sont plus à risque d'hypofertilité, notamment celles exposant fréquemment le corps à la chaleur. L'âge a beaucoup moins d'influence que chez la femme. Le pouvoir fécondant reste élevé après 50 ans, mais il existe un risque de maladies génétiques plus élevé, et on note une augmentation du risque de fausses couches chez les conjointes d'hommes de

plus de 45 ans, indépendamment de l'âge des femmes. Le tabac semble, comme chez la femme, être un facteur d'hypofertilité en entraînant une altération des caractères spermatiques.

L'infertilité est une situation provoquant généralement un stress important au sein du couple, avec notamment une vie sexuelle moins bien vécue (rapports sexuels moins fréquents, moins satisfaisants, « programmés »). La fréquence des rapports sexuels est un paramètre à ne pas négliger, et il est bien établi que l'augmentation de la fréquence des rapports sexuels en période pré-ovulatoire augmente le taux de grossesse.

II – PRISE EN CHARGE D’ UN COUPLE EN ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION

Un couple vient consulter quand un délai trop long s’est écoulé sans obtenir une grossesse, généralement au bout d’environ deux ans. La consultation, et les résultats du bilan prescrit à cette occasion permettent au médecin d’orienter le couple vers une attitude thérapeutique adaptée à leur situation. L’induction de l’ovulation, avec rapports sexuels programmés ou insémination intra-utérine peut être proposée en première intention à des couples présentant une infertilité idiopathique, une dysovulation, une altération modérée des paramètres spermioologiques. Dans les autres cas, ou en cas d’échec des prises en charge antérieures, la fécondation *in vitro* est proposée au couple. Le principe est de réunir *in vitro* les conditions nécessaires à l’interaction entre les spermatozoïdes et les ovocytes, et de placer certains des embryons ainsi obtenus dans l’utérus de la patiente. Il est nécessaire de réaliser une hyperstimulation ovarienne contrôlée afin d’obtenir plusieurs ovocytes, augmentant ainsi le nombre d’embryons potentiellement obtenus.

A – Protocoles de stimulation

Le choix du protocole de stimulation ovarienne se fait au cas par cas. Les critères hormonaux, échographiques, l’âge, les antécédents éventuels de stimulation ovarienne, entrent en ligne de compte pour la décision thérapeutique. Une fois le protocole choisi parmi les trois principaux existant, il faut encore déterminer la posologie de départ puis adapter très régulièrement celle-ci en fonction de critères hormonaux (voir infra) et échographiques. Ainsi, les protocoles ne sont que des cadres généraux, au sein desquels chaque femme suit une stimulation ovarienne personnalisée et adaptée pour aboutir au meilleur résultat possible.

1 - Protocole long

C'est le protocole le plus largement utilisé ; environ 65% des stimulations (tableau 1). Il est généralement utilisé chez des femmes ayant une réponse ovarienne satisfaisante. Le traitement commence par une désensibilisation hypophysaire complète par l'administration d'agoniste du récepteur hypophysaire au GnRH pendant environ 15 jours. Une échographie et un dosage d'oestradiol vérifient la mise au repos des ovaires, puis les injections de FSH recombinante sont débutées et les doses adaptées à la patiente, ses antécédents et les résultats de la surveillance biologique et échographique. L'administration de l'agoniste est poursuivie conjointement aux gonadotrophines à la même dose ou en divisant la dose par deux (protocole long demi-dose). La FSH peut être administrée selon un schéma « *step down* », basé sur des doses décroissantes et permettant un recrutement folliculaire important, ou selon un schéma « *step up* », basé sur des doses croissantes à partir du septième jour de stimulation.

Les principaux produits pouvant être utilisés lors de ces protocoles sont les suivants. Tout d'abord, on utilise des agonistes de GnRH (D triptoréline DECAPEPTYL[®]), qui ont une demi-vie longue et qui miment une sécrétion continue et non pulsatile de GnRH. Après les 48 premières heures où l'hypophyse est fortement stimulée (effet « *flare up* »), une désensibilisation hypophysaire réversible est induite et empêche un pic de LH endogène, ce qui améliore l'organisation de la stimulation. On utilise également des gonadotrophines, et plus particulièrement la FSH recombinante humaine (GONAL-F[®], PUREGON[®]). Elle se substitue à la FSH endogène pour induire la croissance et la maturation folliculaires, avec une prolifération et une différenciation des cellules de la granulosa, l'aromaturation des androgènes et l'apparition de récepteurs à la LH. Les gonadotrophines d'origine humaine peuvent toujours être utilisées.

2 - Protocole court

Ce protocole peut être proposé à des femmes pour lesquelles on redoute une faible réponse ovarienne. Dans les deux premiers jours de son administration, l'agoniste entraîne une libération massive de gonadotrophines hypophysaires : c'est l'effet « *flare up* » qui est mis à profit pour initier le recrutement folliculaire. Les injections de FSH recombinante débutent en même temps que le traitement par l'agoniste du GnRH et assurent la suite de la croissance folliculaire. Ce protocole s'adresse principalement aux patientes dites « mauvaises répondeuses » lorsque les doses de FSH sont importantes.

3 - Protocole antagoniste

Les antagonistes du GnRH (Cétrorélix CETROTIDE[®], ganirélix ORGALUTRAN[®]) sont plus récemment apparus, et sont actuellement utilisés en pratique courante. Ils n'entraînent pas d'effet *flare up* et ne nécessitent pas de période de désensibilisation. Ils sont administrés en cours de phase folliculaire quand apparaît un risque d'ovulation spontanée, soit à la dose quotidienne de 0,25 mg, soit en une dose de 3 mg. Ils permettent entre autre une moindre consommation d'ampoules de FSH, un raccourcissement de la durée de la stimulation et une diminution des effets secondaires par rapport aux agonistes. Ils sont utilisés principalement pour éviter un pic imprévu de LH endogène qui compromettrait le recueil ovocytaire. L'antagoniste peut être administré de façon fixe, généralement à partir du sixième jour de stimulation, ou de façon flexible, lorsque le monitoring fait craindre une ovulation précoce.

Le citrate de clomifène (CLOMID[®], PERGOTIME[®]) peut être utilisé dans certains cas en début de cycle, conjointement aux gonadotrophines. C'est un anti-oestrogène : il inhibe leur rétrocontrôle hypothalamique, et induit ainsi la libération de FSH hypophysaire.

Le tableau I reprend les caractéristiques de l'usage des différents protocoles de stimulation ovarienne en fécondation *in vitro*.

Protocole de stimulation		Court	Long	Antagoniste	Autres
Fréquence en 2001 (%)		12,0	66,1	13,8	8
Fréquence en 2002 (%)		11,5	60,0	19,0	9,5
	2001 FIV / ICSI (%)	10,9 / 13,1	68,1 / 64,1	13,0 / 14,7	8 / 8,1
	2002 FIV / ICSI (%)	11,0 / 12,0	62,2 / 57,9	16,9 / 21,1	9,9 / 9,1
Age ± écart-type		35,5 ± 4,7	33,5 ± 4,6	34,4 ± 4,7	34,4 ± 4,8
	2001	35,4 ± 4,6	33,5 ± 4,5	34,6 ± 4,7	34,4 ± 4,6
	2002	35,7 ± 4,7	33,6 ± 4,7	34,2 ± 4,7	34,5 ± 5,0
Rang de tentative moyen 2001		2,4 ± 1,6	2,0 ± 1,4	2,5 ± 1,7	2,2 ± 1,5
Rang de tentative moyen 2002		2,5 ± 1,7	2,1 ± 1,4	2,6 ± 1,7	2,1 ± 1,5
Patientes normo-ovulantes 2001 (%)		75,8	72,1	69,5	71,9
Patientes normo-ovulantes 2002 (%)		75,8	73,2	70,4	67,3

Tableau I : Caractéristiques de l'usage des différents protocoles de stimulation en 2001 et 2002 (n = 63550 cycles). (Pouly, Bachelot *et al.* 2004)

B - Bilan hormonal dans la prise en charge d'un cycle de stimulation ovarienne

Le bilan hormonal est un élément fondamental du bilan avant toute prise en charge. Il permet d'évaluer la réserve folliculaire ovarienne et de proposer aux patientes le protocole le mieux adapté. Au cours du cycle de stimulation ovarienne, et en association avec le suivi échographique, il permet d'évaluer le recrutement puis la croissance folliculaire, d'ajuster quotidiennement le traitement et de programmer le déclenchement de l'ovulation. Le bilan hormonal est réalisé au début de la phase folliculaire d'un cycle menstruel, généralement au troisième jour (J3), en-dehors de toute stimulation ovarienne. Il comprend le dosage de la FSH, de la LH, de l'oestradiol et éventuellement de l'inhibine B, de la prolactine et plus récemment l'Hormone anti-Müllerienne (AMH) (Taieb, Benattar *et al.* 2003).

1 – Le dosage de FSH

Le taux de FSH à J3 est globalement corrélé au nombre de follicules antraux et à la réserve ovarienne. Une concentration circulante élevée de FSH, généralement supérieur à 10 UI/L, fait craindre une mauvaise réponse ovarienne à la stimulation, avec peu d'ovocytes ponctionnés, peu d'embryons obtenus, et donc un faible taux de grossesse. Cependant, le dosage de FSH pose quelques problèmes. Tout d'abord, il est fluctuant d'un cycle à l'autre chez une même patiente. D'autre part, il existe de nombreux isoformes de la FSH avec un degré de glycosylation variable qui entraîne une bioactivité variable au cours du cycle. Ceci pose la question de la spécificité des dosages qui utilisent un (ou deux) anticorps monoclonaux reconnaissant tout ou partie de la molécule, et explique en partie les importantes discordances entre les différentes techniques. Le seuil décisionnel devrait en théorie être déterminé pour chaque technique afin d'éviter les erreurs d'appréciation. Malgré tout, le dosage de FSH reste un élément indispensable dans l'évaluation du statut ovarien de la patiente avant de débiter une prise en charge, même s'il ne permet pas d'établir un pronostic formel sur les chances de grossesse d'une patiente.

2 – Le dosage de l'oestradiol

Le dosage de l'oestradiol présente globalement les mêmes avantages et inconvénients que le dosage de la FSH. En effet, il permet d'estimer grossièrement la réserve ovarienne et une valeur élevée (> 50 pg/mL) en début de cycle évoque une patiente mauvaise répondeuse. Cependant, la variabilité importante entre les techniques, et leur sensibilité moyenne dans les valeurs basses doivent inciter à la prudence dans l'interprétation en début de cycle.

3 – Le dosage de la LH

Le dosage de la LH en début de cycle peut donner deux informations. Une valeur élevée, avec un rapport LH/FSH supérieur à deux, est un argument en faveur d'un syndrome des ovaires polykystiques, à confronter notamment aux arguments échographiques. Une valeur très basse (inférieure à 1 UI/L) est un facteur prédictif d'insuffisance ovarienne. Enfin, on retrouve les mêmes problèmes de variabilité inter technique que pour la FSH.

4 – Le dosage de l'inhibine B

L'inhibine B, protéine produite par les cellules de la granulosa est un inhibiteur de la production de FSH. Son dosage permet d'estimer la capacité sécrétoire et la réserve ovarienne. Une valeur basse (inférieure à 45 pg/mL) fait craindre une mauvaise réponse à la stimulation ovarienne, mais la valeur prédictive de l'inhibine B reste controversée.

En effet, une étude de Fanchin *et al* en 2003 montre que l'inhibine B est beaucoup moins corrélée au nombre de petits follicules antraux que l'AMH ($r= 0,29$ versus $r=0,74$), et qu'elle n'est pas corrélée à l'âge, contrairement à l'AMH. Une autre étude plus récente de Hazout *et al* en 2004 a comparé la valeur prédictive de l'inhibine B, l'AMH, la FSH et l'oestradiol en terme de réponse ovarienne et d'issue de stimulation. Seule l'AMH s'est montré un marqueur discriminant avec une différence significative selon la réponse ovarienne et l'obtention d'une grossesse. Ces deux études tendent donc à montrer que l'inhibine B n'est ni un bon reflet du statut ovarien, ni un bon facteur prédictif de succès d'un cycle de fécondation *in vitro*. (Fanchin, Schonauer *et al*. 2003; Hazout, Bouchard *et al*. 2004)

Le tableau II schématise les différents profils hormonaux et le pronostic associé.

FSH (UI/L)	LH (UI/L)	E2 (pg/mL)	Inhibine B (pg/mL)	Pronostic de réponse à la stimulation, profil de la patiente
< 5	< 6	< 45	> 45	Bonne réponse, patiente « normo-répondeuse »
> 10	> 6	> 60	< 45	Mauvaise ou non-réponse, patiente en péri-ménopause
> 10	< 6	< 45	> 45	Réponse si stimulation adaptée, patiente en insuffisance ovarienne débutante
> 10	< 6	> 45	< 45	Non-réponse, patiente en insuffisance ovarienne sévère
< 10	< 6	> 70	< 45	Non-réponse, patiente en insuffisance ovarienne sévère
< 5	> 6	> 45	> 45	Bonne réponse, patiente pouvant présenter un syndrome d'ovaire plurifolliculaire, de bon pronostic
< 5	> 6	> 45	< 45	Non-réponse, patiente pouvant présenter un syndrome d'ovaire plurifolliculaire, de mauvais pronostic

Tableau II : Bilan hormonal à J3 du cycle menstruel, pronostic de la réponse à une stimulation ovarienne et profil de la patiente. (Taieb, Benattar *et al.* 2003)

En conclusion, le bilan hormonal standard est un élément indispensable en début de prise en charge et les marqueurs biologiques qui le composent donnent des informations essentielles sur le statut ovarien de la patiente (Tableau II). Cependant, il faut rester critique à l'égard de ces dosages et de leur variabilité, et ne pas hésiter à réévaluer périodiquement ce bilan. Enfin, de nombreuses études récentes montrent l'intérêt de l'**Hormone Anti-Müllérienne** (AMH) comme marqueur de la réserve ovarienne et comme facteur prédictif de l'issue du cycle de stimulation. (Hamamah S. 2001) ; (Olivennes F. 2002)

AMH

STRUCTURE, EXPRESSION ET FONCTION

I - ORGANISATION GÉNOMIQUE : GÈNE ET RÉGULATION DE L'EXPRESSION

Le gène qui code pour l'Hormone Anti-Müllerienne (AMH) est localisé sur le chromosome 19 (**19p13**). Cloné en 1986, il a été largement décrit depuis, sa taille est de 2,8 kilobases. Il est composé de 5 exons et un certain nombre d'altérations génétiques responsables du syndrome de persistance des canaux de Müller (PMDS) ont été décrites. Cette pathologie rare qui touche le fœtus de caryotype XY est due à une anomalie de l'action de l'AMH, qui n'entraîne pas de régression des canaux de Müller, et correspond cliniquement à un pseudohermaphrodisme avec organes génitaux externes normalement virilisés et persistance de dérivés des canaux de Müller, à savoir un utérus et des trompes. Cette pathologie est habituellement associée à une cryptorchidie uni ou bilatérale, et découverte à l'occasion de l'intervention chirurgicale (Rey and Picard 1998).

Ce gène est exclusivement exprimé dans les gonades, à savoir les cellules de Sertoli chez l'homme et les cellules de la granulosa chez la femme. Son expression est hautement régulée. En effet, son promoteur comporte de nombreux sites de liaison pour des facteurs de transcription, tels que le facteur SF-1 (Steroidogenic Factor 1), Sox9. Ainsi, la translocation nucléaire de SF-1 et la fixation sur son promoteur induit une activation du promoteur avec augmentation de l'expression du gène codant pour l'AMH. (Lasala, Carre-Eusebe *et al.* 2004). D'autre part, de nombreux facteurs hormonaux régulent l'expression de ce gène. Ainsi, la FSH et les androgènes répriment l'expression de l'AMH, mais aussi de son récepteur de type 2. (Josso, di Clemente *et al.* 2001; Belville, Van Vlijmen *et al.* 2004; Picard and Belville 2002; Rey, Lukas-Croisier *et al.* 2003)

Figure visible sur la thèse papier

Figure 1 - Structure schématique du gène codant pour l'AMH et localisation des principales altérations génétiques responsables du syndrome de persistance des canaux de Müller.

(Teixeira, Maheswaran *et al.* 2001)

II - STRUCTURE DE LA PROTÉINE

L'AMH est une glycoprotéine dimérique de 140 000 daltons appartenant à la superfamille du TGF- β (Transforming Growth Factor β). La protéine mature est constituée de 535 acides aminés et comporte deux domaines: un domaine C-terminal court (109 acides aminés), porteur de l'activité biologique, et un domaine N-terminal long (426 acides aminés) dépourvu d'activité intrinsèque. L'homologie de séquence avec les autres membres de la famille du TGF β concerne uniquement la région C-terminale. (Rey, Lukas-Croisier *et al.* 2003; Josso, di Clemente *et al.* 2001; Gruijters, Visser *et al.* 2003)

Figure visible sur la thèse papier

Figure 2 - Structure schématique de l'AMH et maturation de la protéine.
(Josso and Clemente 2003)

Figure visible sur la thèse papier

Figure 3 - Représentation tridimensionnelle du domaine
(Belville, Van Vlijmen *et al.* 2004)

III - RÉCEPTEURS DE L'AMH

L'action biologique de l'AMH se fait à l'aide de deux types de récepteurs transmembranaires : un récepteur de type I (*AMHR1*) et un récepteur de type II (*AMHR2*). Ce sont des récepteurs sérine-thréonine kinase à un domaine transmembranaire.

A - AMHR1

Il appartient à l'ensemble des membres d'une sous-famille des récepteurs du TGF β qui appartient au BMP (Bone Morphogenetic Proteins). Les caractéristiques structurales et fonctionnelles de ce récepteur ne sont pas encore clairement définies. Son territoire d'expression semble plus large que pour *AMHR2*. Plusieurs récepteurs candidats ont été désignés par des études récentes : les trois plus probables sont *ALK2*, *ALK3* et *ALK6*. Les relations précises entre *AMHR2* et ces récepteurs restent à définir.

B - AMHR2

Le récepteur de type II est quant à lui bien caractérisé. Il est constitué de 573 acides aminés et a un poids moléculaire de 82 kDA dans sa forme mature. Son domaine extracellulaire permet la liaison du ligand, et porte deux sites potentiels de glycosylation. Le domaine intracellulaire porte l'activité sérine-thréonine kinase, mais n'a pas d'activité d'autophosphorylation. (Salhi, Cambon-Roques *et al.* 2004)

Le gène responsable de son expression est constitué de 11 exons. Le premier code pour le peptide signal, le deuxième et le troisième pour le domaine extracellulaire, le quatrième pour le domaine transmembranaire et les sept derniers pour le domaine

intracellulaire à activité sérine/thréonine kinase. Différentes altérations génétiques du gène codant pour AMHR2 ont été caractérisées. Ce sont essentiellement des mutations non-sens et faux –sens réparties sur l'ensemble des exons. Ainsi, plus de 25 mutations sont caractérisées à ce jour et sont responsables d'environ 40% des cas de persistance des canaux de Müller. (Picard and Belville 2002; Josso, Belville *et al.* 2005). Le promoteur contient divers sites de liaison pour des facteurs de transcription spécifiques des cellules gonadiques où il est exprimé. Parmi les principaux, on retrouve les régulateurs de l'expression du gène de l'AMH, à savoir SF-1, Sox9, Sp1.

Contrairement aux autres membres de la famille du TGF β , *AMHR2* n'est exprimé que dans les gonades et les organes reproducteurs (testicules et ovaires), où l'AMH exerce ses effets biologiques. Dans les canaux de Müller, le récepteur est exprimé dans le mésenchyme, mais pas dans l'épithélium, ce qui montre que l'AMH agit via le mésenchyme pour induire l'apoptose des cellules épithéliales. (Deffieux and Antoine 2003; di Clemente, Josso *et al.* 2003; Josso, di Clemente *et al.* 2001)

Figure visible sur la thèse papier

Figure 4 - Structure schématique du gène codant pour AMHR2 et répartition de ses principales altérations génétiques. (Teixeira, Maheswaran *et al.* 2001)

IV - VOIE DE SIGNALISATION

La liaison de l'AMH à l'AMHR2 induit l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire. Les deux types de récepteurs, AMHR1 et AMHR2, sont étroitement liés et leur action est coordonnée. Ainsi, le domaine extracellulaire du récepteur de type II lie spécifiquement l'AMH, ce qui entraîne le recrutement du récepteur de type I et la formation d'un hétérodimère [AMHR1 – AMHR2]. Le récepteur de type II peut alors phosphoryler les résidus sérine et thréonine du domaine intracellulaire du récepteur de type I. Cette phosphorylation induit l'activité kinase du domaine intracellulaire de AMHR1, ce qui va permettre la phosphorylation des protéines intracellulaires Smad1, 5 et 8. Ces protéines phosphorylées vont être transloquées dans le noyau, se liant au passage à la protéine Smad4 qui est un activateur transcriptionnel, pour y réguler l'expression des gènes cibles. Le complexe Smad se lie au promoteur de ces gènes, mais cette interaction n'est pas spécifique. Le choix spécifique des gènes cibles par un complexe Smad est dicté par son association à des cofacteurs liés à l'ADN spécifiques de la cellule exprimant les récepteurs de l'AMH. Les principaux gènes cibles dont l'expression est régulée par l'AMH sont répertoriés dans le tableau III.

Cette voie de signalisation subit un rétrocontrôle négatif via 2 protéines, Smad 6 et Smad 7. Ces protéines sont des inhibiteurs de cette voie de signalisation, et leur synthèse est induite par l'AMH. Il est à noter que cette voie de signalisation a des connexions avec d'autres voies de signalisations connues, notamment celles impliquant la *β-caténine* et le Nuclear Factor κ B (*NF- κ B*), impliqué dans la médiation de la réponse inflammatoire. Ces voies de signalisation annexes pourraient jouer un rôle mineur dans l'action biologique de l'AMH. Ces voies de signalisation sont schématisées sur la figure 5. (Visser 2003; Josso and Clemente 2003; Deffieux and Antoine 2003; di Clemente, Josso *et al.* 2003; Xavier and Allard 2003)

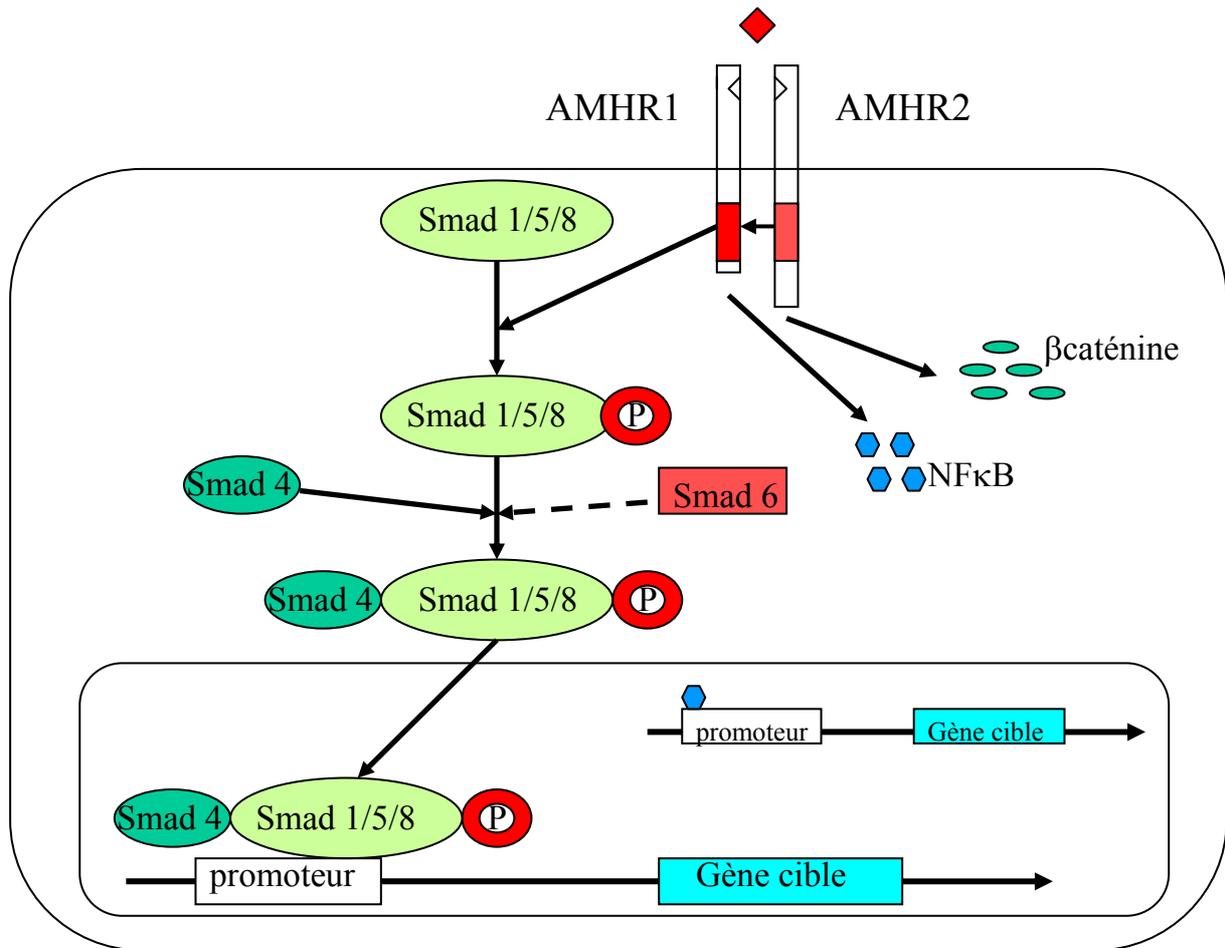


Figure 5 - Représentation schématique des voies de signalisation intracellulaires induites par l'AMH. (D'après Teixeira, Maheswaran *et al.* 2001)

Gène cible	Protéine codée	rôle	Action de l'AMH
<i>LHCGR</i>	Récepteur à la LH	Différenciation des cellules de Leydig	répression
<i>CYP19</i>	Cytochrome P450 aromatase	Synthèse d'oestradiol à partir des androgènes	Répression de l'expression entraînant une inhibition de la stéroïdogénèse
<i>HSD3B1</i>	3 β -hydroxysteroid dehydrogenase	Stéroïdogénèse	
<i>CYP17</i>	Cytochrome P450 17 α -hydroxylase/C ₁₇₋₂₀ lyase	Stéroïdogénèse	
<i>CYP11A</i>	Cytochrome P450 side chain cleavage enzyme	Stéroïdogénèse	
<i>CDKN2A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor p16	Gène suppresseur de tumeur	
<i>AMHR2</i>	Récepteur à l'AMH type 2	Liaison de l'AMH et activation de la voie de signalisation intracellulaire	Feed-back négatif
<i>MMP2</i>	Matrix metalloproteinase	Induction de l'apoptose dans les canaux de Müller	Induction de l'expression de MMP2
<i>SMAD6</i>	Protéine Smad6	Inhibition de la voie de signalisation intracellulaire de l'AMH	Induction de l'expression de Smad6

Tableau III : Principaux gènes cibles et effets de l'AMH (D'après Josso 2003)

V - EXPRESSION DE L'AMH ET RÉGULATION

Contrairement aux autres membres de la famille du TGF β qui sont largement exprimés et ont un large répertoire d'activités biologiques, l'AMH n'est exprimée que dans les gonades et exerce ses effets inhibiteurs de manière autocrine et paracrine sur le développement et le fonctionnement des organes reproducteurs.

A - Chez l'homme

L'AMH est exclusivement synthétisée par les cellules de Sertoli dès la différenciation sexuelle. L'expression est forte jusqu'à la puberté où, sous l'influence de l'élévation de la concentration intra-testiculaire en testostérone, elle commence à décroître jusqu'à devenir très faible chez l'adulte. Il existe une corrélation négative entre l'AMH sérique et la testostérone sérique lors d'une puberté normale (Teixeira, Fynn-Thompson *et al.* 1999). Cependant, pendant la vie fœtale et en post-natal, l'AMH est élevée malgré une forte concentration en androgènes, du fait de la relative insensibilité aux androgènes des cellules de Sertoli fœtales et néonatales. La figure 6 illustre la variation de sécr Années AMH en fonction de la concentration en testostérone.

Figure visible sur la thèse papier

Figure 6 - Corrélation inverse de la testostérone et de l'AMH sériques chez l'homme. (Teixeira, Maheswaran *et al.* 2001).

Les cellules germinales spermatiques joueraient également un rôle dans la régulation de la sécrétion de l'AMH par les cellules de Sertoli. Une altération de la spermatogénèse, avec une diminution du nombre de cellules en méiose, lève la répression de la synthèse de l'AMH par les androgènes à la puberté. De plus, les patients atteints d'insensibilité aux androgènes ou de déficit en androgènes ont des taux très élevés d'AMH en néonatal et après la puberté. (Rey 2000; Rey, Sabourin *et al.* 2000; Fujisawa, Yamasaki *et al.* 2002; Rey, Lukas-Croisier *et al.* 2003)

Les concentrations physiologiques d'AMH chez l'homme en fonction de l'âge et du stade pubertaire sont reportées dans le tableau IV.

B - Chez la femme

L'AMH est synthétisée exclusivement par les cellules de la granulosa de la fin de la vie fœtale jusqu'à la ménopause. (Visser and Themmen 2005; Rey, Lukas-Croisier *et al.* 2003). La régulation de la synthèse de l'AMH par les cellules de la granulosa est encore mal connue. Il a été montré récemment que l'ovocyte joue un rôle sur l'expression du gène de l'AMH dans les cellules de la granulosa. La nature exacte de ce mécanisme paracrine de régulation est en cours de caractérisation. On observe une légère augmentation de l'expression au moment de la puberté, mais elle reste modérée. Sa sécrétion diminue progressivement chez l'adulte pour devenir indétectable chez la femme ménopausée. La synthèse débute lors du recrutement initial. Elle est élevée dans les cellules de la granulosa des follicules en croissance (follicules pré-antraux et petits follicules antraux) puis la synthèse diminue progressivement lors de la croissance et la différenciation folliculaire. Enfin, les cellules de la granulosa des follicules atériques synthétisent très peu d'AMH, et la synthèse est nulle dans les follicules primordiaux et le corps jaune. (Deffieux and Antoine 2003)

Le suivi de la concentration de l'AMH pendant un cycle de stimulation ovarienne confirme bien la diminution progressive de la sécrétion lors de la croissance folliculaire (figure 7). A l'inverse, lors d'un cycle menstruel sans stimulation, on observe une légère augmentation de l'AMH au moment de l'ovulation. Les concentrations circulantes en AMH sont, au début de la phase folliculaire, lors de l'ovulation et lors de la phase lutéale respectivement 1,4 , 1,7 et 1,4 ng/mL (Cook, Siow *et al.* 2000). L'augmentation au moment de l'ovulation reste ainsi modérée et autorise en théorie le dosage de l'AMH à tout moment du cycle.

Figure visible sur la thèse papier

Figure 7 - Evolution de la concentration sérique en AMH lors de la phase folliculaire d'une stimulation ovarienne contrôlée.(Fanchin, Schonauer *et al.* 2003)

Les concentrations physiologiques d'AMH chez l'homme et la femme en fonction de l'âge et du stade pubertaire sont reportées dans le tableau IV.

		AMH sérique (ng/mL)	
Âge		Moyenne \pm SD	Etendue (99%)
♂	10 jours – 1 an	67,1 \pm 5,7	50,9 – 83,2

Taux de
base

J28

J8

hCG

	1 – 4 ans	71,2 ± 9,7	42,7 – 99,5	
	4 – 7 ans	61,3 ± 8,4	36,4 – 85,9	
	7 – 9 ans	47,0 ± 6,6	27,2 – 66,9	
	> 9 ans stades pubertaires (Tanner)	I	34,9 ± 3,7	24,5 – 45,2
		II	22,2 ± 3,5	12,3 – 32,2
		III	11,0 ± 3,9	ND – 15,4
		IV - V	6,7 ± 1,9	ND – 13,7
Adultes	4,2 ± 0,6	ND – 5,8		
Femmes	Prépubères	3,3 ± 2,9	ND – 10,5	
	Adultes (puberté – ménopause)	2,0 ± 2,8	ND – 10,5	

Tableau IV : Concentration sérique physiologique d'AMH chez l'homme et la femme.
(Dosage réalisé avec la trousse ELISA Immunotech® Beckman Coulter) (Rey, 2000)

VI - ACTIVITÉ PHYSIOLOGIQUE DE L'AMH

A – Chez la femme

1 - Généralités sur la folliculogénèse

De la puberté à la ménopause, l'ovaire humain assure une fonction endocrinienne et une fonction gamétogène. Les follicules commencent à se former pendant le quatrième mois de grossesse : chaque ovaire contient environ 300 000 follicules primordiaux à la naissance. L'involution par apoptose des petits follicules et leur entrée en croissance contribuent à l'épuisement progressif de la réserve ovarienne. Les mécanismes responsables du recrutement initial, c'est-à-dire le passage du follicule primordial au stade petit follicule primaire sont encore mal connus. Lors de la croissance folliculaire, le diamètre s'accroît, la zone pellucide est synthétisée par les cellules de la granulosa qui elles-mêmes prolifèrent : on obtient un follicule secondaire autour duquel se développe une vascularisation lui permettant de devenir réceptif aux facteurs hormonaux. La thèque se développe, en deux feuillets, lors du passage au stade préantral, et le follicule devient sensible à la FSH et à la LH. Ce développement de follicules préantraux se fait sous forme de vagues de croissance folliculaire ou recrutement cyclique, à tout moment du cycle. Une seule vague donnera naissance au follicule ovulatoire, elle se produit après l'ovulation précédente. En fin de phase lutéale, 3 à 11 follicules antraux de 2 à 5 mm par ovaire sont sélectionnables. La sélection est réalisée principalement sous l'action de la FSH et le follicule dominant entre dans la phase finale de maturation pré-ovulatoire, période d'intense division des cellules de la granulosa et d'augmentation de la vascularisation. (Gruijters, Visser *et al.* 2003)

2 - Rôle physiologique de l'AMH au niveau de l'ovaire

Les études menées chez des souris knock-out pour l'AMH ont montré qu'elle avait un rôle inhibiteur paracrine sur le recrutement initial des follicules primordiaux. En effet, ces souris naissent avec un nombre normal de follicules, mais cette réserve ovarienne s'épuise rapidement avec un nombre plus important de follicules recrutés et entrant en croissance. Ceci a été confirmé *in vitro* par la culture d'ovaires en l'absence d'AMH. L'AMH évite donc une déplétion folliculaire précoce en inhibant le recrutement initial.

Ces études *in vivo* chez la souris et *in vitro* ont également montré le rôle modulateur de l'AMH dans le recrutement cyclique folliculaire (Durlinger, Kramer *et al.* 1999). Ces souris knock-out pour l'AMH avaient en effet plus de follicules antraux en croissance que les souris contrôles, malgré des taux bas de FSH. Il semble donc que l'AMH diminue la sensibilité des follicules antraux à la FSH, et module ainsi le recrutement cyclique (Durlinger, Gruijters *et al.* 2001). Ceci est confirmé par les études *in vitro* qui ont montré l'effet inhibiteur de l'AMH sur la croissance folliculaire FSH-dépendante (figure 8). D'autre part, l'AMH régule la stéroïdogénèse ovarienne (Teixeira, Fynn-Thompson *et al.* 1999) en diminuant notamment l'expression de l'aromatase des cellules de la granulosa, ce qui diminue donc la production d'oestradiol. Enfin, l'AMH réduit le nombre de récepteurs à la LH sur les cellules de la granulosa stimulées par la FSH. (Gruijters, Visser *et al.* 2003; Visser and Themmen 2005)

Figure visible sur la thèse papier

Figure 8 - Action régulatrice de l'AMH sur l'ovaire post-natal : (1) L'AMH inhibe le recrutement initial et (2) inhibe l'effet stimulateur de la FSH sur la croissance des follicules préantraux et antraux. (Durlinger, Visser *et al.* 2002)

B – Chez l'homme

1 - Généralités sur la spermatogénèse

Le testicule est organisé en deux compartiments distincts : les tubes séminifères, comprenant les cellules de Sertoli et les cellules germinales, et le tissu intersticiel, avec notamment les cellules de Leydig. Les cellules de Sertoli ont un rôle fondamental de soutien et de régulation endocrinienne, alors que les cellules de Leydig sont principalement impliquées dans la stéroïdogénèse. La spermatogénèse est le processus mis en place à la puberté aboutissant à la production de spermatozoïdes après prolifération et différenciation des spermatogonies. Comme dans l'ovogénèse, la méiose est essentielle dans la transmission de l'information génétique. Ce processus est hautement régulé, principalement par la FSH et la testostérone.

2 - Rôle physiologique au niveau testiculaire

L'AMH agit au début de la différenciation sexuelle en entraînant la régression des canaux de Müller par induction de l'apoptose des cellules épithéliales canalaire chez le fœtus de sexe masculin (Rey and Picard 1998). Chez l'homme adulte, l'AMH régule la différenciation et la prolifération des cellules germinales et des cellules de Leydig, ainsi que la stéroïdogénèse, en inhibant la biosynthèse de testostérone.

VII – CIRCONSTANCES DE DOSAGE DE L'AMH

L'AMH est une hormone spécifiquement sécrétée par les gonades : les cellules de Sertoli chez l'homme et les cellules de la granulosa chez la femme. Les différences importantes dans les concentrations, la durée et la période de cette production chez l'homme et chez la femme font que les applications du dosage en clinique humaine sont très différentes selon les sexes.

A - Chez l'homme

L'AMH sérique reflète l'activité fonctionnelle et le nombre des cellules de Sertoli avant la puberté, sans besoin de stimulation exogène par les gonadotrophines, contrairement à la testostérone. Son dosage permet ainsi d'évaluer, sans injection d'hCG, la présence de testicules ectopiques dans les cas des cryptorchidies bilatérales. Ainsi, en cas d'anorchie, l'AMH est indétectable. (figure 9)

Figure visible sur la thèse papier

Figure 9 - Concentration sérique d'AMH chez des garçons avec une cryptorchidie bilatérale. (Lee, Misra *et al.* 2003)

Le bilan d'une ambiguïté sexuelle comporte ainsi le dosage de la testostérone et de l'AMH. Si le caryotype de l'enfant est 46,XY, une valeur élevée d'AMH permet d'éliminer une dysgénésie gonadique. Une valeur élevée de la testostérone oriente alors vers une

insensibilité aux androgènes par mutation de leur récepteur, et une valeur basse vers une déficience dans la production des androgènes testiculaires. (Lee, Misra *et al.* 2003)

Si le caryotype est 46,XX , une AMH supérieure à 75 pmol/L affirme la présence de tissu testiculaire et oriente alors vers un hermaphrodisme vrai en cas d'ambiguïté sexuelle, ou vers un diagnostic de mâle XX si les organes génitaux externes sont normalement virilisés.

Dans les cas de puberté précoce, correspondant à l'apparition de signes de puberté avant 10 ans, l'AMH sérique est anormalement basse pour l'âge, en lien avec une concentration élevée de testostérone. Une puberté précoce peut être d'origine centrale, fréquemment liée à la présence d'une tumeur intracrânienne, ou indépendante des gonadotrophines avec hypersécrétion de testostérone due à une hyperplasie congénitale des surrénales ou à une tumeur surrénalienne ou testiculaire. L'AMH sérique revient à des valeurs prépubères en quelques mois d'un traitement efficace avec contrôle de la production de testostérone.

Suite à l'apparition à la puberté de spermatozoïdes méïotiques et à la formation d'une barrière hémato-testiculaire, la concentration d'AMH chute dans le sérum, mais reste significative dans le plasma séminal. Dans le cas d'une azoospermie non obstructive, la présence d'AMH dans le plasma séminal, associée à d'autres marqueurs, montre la présence probable de foyers de spermatogénèse conservée et oriente vers une biopsie testiculaire quand on envisage une FIV-ICSI (Fujisawa, Yamasaki *et al.* 2002)

Dans les cas d'hypogonadisme hypogonadotrope congénital, l'inhibition de la synthèse d'AMH par les androgènes à la puberté ne se fait pas, et les cellules de Sertoli conservent une sécrétion élevée d'AMH. Le traitement par hCG fait remonter la concentration de testostérone et fait baisser celle de l'AMH à des valeurs comparables à celles de l'adulte.

L'AMH est également un bon marqueur d'évaluation de l'efficacité des antagonistes et des agonistes partiels du GnRH. Une castration chimique efficace, avec mise au repos de l'axe hypothalamo-hypophysaire et inhibition de la production testiculaire d'androgènes se traduit par une élévation de l'AMH sérique. (Rey 2000)

B - Chez la femme

Deux contextes cliniques justifient le dosage de l'AMH chez la femme.

1 - Les tumeurs de la granulosa

Les tumeurs de la granulosa sont des tumeurs ovariennes rares, elles représentent 1 à 2% de l'ensemble des tumeurs ovariennes, mais 6 à 10% des tumeurs malignes de l'ovaire. Elles sont d'évolution lente et de faible malignité si elles sont diagnostiquées et opérées avant l'envahissement des organes voisins, mais ont une forte tendance à la récurrence, même plusieurs années après le traitement initial. Les cellules tumorales sécrètent en forte quantité des hormones comme l'inhibine et surtout l'AMH, dont la concentration devient indétectable si la tumeur est extirpée complètement. Le taux d'AMH remonte précocement en cas de récurrence, longtemps avant l'apparition des signes cliniques, ce qui en fait un marqueur tumoral sensible, spécifique, permettant l'évaluation du traitement et la détection précoce de récurrences au cours du suivi. (Long, Wang *et al.* 2000; Long, Ranchin *et al.* 2000; Rey, Sabourin *et al.* 2000; di Clemente, Josso *et al.* 2003)

2 - Evaluation de la réserve ovarienne

La réserve ovarienne est le reflet du statut ovarien et permet donc d'évaluer le pronostic d'une stimulation ovarienne pour fécondation *in vitro*. Cette réserve ovarienne correspond à la taille du stock de follicules primordiaux, qui diminue progressivement avec l'âge, et à la qualité ovocytaire. Il est difficile de mesurer ce stock de follicules primordiaux directement, et il est préférable de s'intéresser au nombre de follicules primaires recrutés. Un marqueur qui reflèterait ces petits follicules antraux ayant fait la transition du stock primordial au pool en croissance serait un bon reflet indirect de la réserve ovarienne, au même titre que l'échographie. L'AMH, hormone impliquée dans le recrutement initial et le recrutement cyclique, et sécrétée principalement par les petits follicules antraux avant la croissance FSH-dépendante, pourrait permettre d'évaluer indirectement cette réserve ovarienne. (de Vet, Laven *et al.* 2002; Deffieux and Antoine, 2003; Seifer, MacLaughlin *et al.* 2002; van Rooij, Broekmans *et al.* 2002; Bath, Wallace *et al.* 2003; Fanchin, Schonauer *et al.* 2003; Gruijters, Visser *et al.* 2003; Hazout, Bouchard *et al.* 2004; La Marca, De Leo *et al.* 2005; Lutchman Singh, Davies *et al.* 2005; Themmen 2005; van Rooij, Broekmans *et al.* 2005)

OBJECTIFS DE L'ETUDE

La prise en charge d'un couple en assistance médicale à la procréation nécessite l'évaluation précise de la situation du couple, avec notamment un bilan hormonal permettant d'évaluer le statut ovarien de la patiente. Pour cela, un marqueur biologique reflétant la situation ovarienne et permettant d'évaluer le pronostic de la procréation médicale assistée serait d'une grande utilité afin d'orienter au mieux la décision thérapeutique. Récemment, l'Hormone Anti-Müllerienne (AMH), nouveau marqueur hormonal prometteur pour lequel il existe deux coffrets de dosage, a montré son intérêt dans cette indication.

Dans le but d'évaluer l'intérêt du dosage de l'AMH en médecine de la reproduction et de comparer les deux trousse disponibles sur le marché, il paraissait intéressant de doser l'AMH sérique chez un groupe de femmes suivies pour fécondation *in vitro* au CHU de Nantes.

Nous avons réalisé une étude prospective sur 69 patientes en cours de stimulation ovarienne pour fécondation *in vitro*, de mars à juin 2005, en réalisant le dosage sérique de l'AMH à J0 de la stimulation par gonadotrophines, en fin de désensibilisation hypophysaire. Parallèlement, l'ensemble des données relatives aux patientes (âge, poids, bilans précédents) et à la stimulation ovarienne en cours (durée de la stimulation, dose de gonadotrophines, nombre d'ovocytes ponctionnés, nombre d'embryons obtenus, début d'une grossesse et évolutivité de celle-ci) étaient recueillies.

L'objectif de l'étude est tout d'abord de comparer les performances analytiques des deux trousse de dosage de l'AMH disponibles sur le marché. D'autre part, on s'attachera dans cette étude à évaluer l'intérêt pronostique du dosage de l'AMH en médecine de la reproduction, tant au niveau de la réponse ovarienne que de l'issue du cycle avec l'initiation d'une grossesse évolutive, et de déterminer si possible des seuils décisionnels pour l'AMH. Enfin, les résultats obtenus devront permettre de choisir la trousse de dosage la mieux adaptée pour le laboratoire de Biochimie Spécialisée et le Service de Biologie de la Reproduction et du Développement (CHU de Nantes) afin de réaliser ce dosage en routine.

PATIENTS, MATERIELS ET METHODES

I – POPULATION DE PATIENTS

L'étude en prospectif porte sur 69 patientes suivies dans le service de Médecine et Biologie de la reproduction de CHU de Nantes (Dr M. JEAN, Pr P. BARRIERE), âgées de 22 ans à 40 ans (âge moyen = 30,2 ans).

Toutes suivaient un protocole long demi-dose, avec injection de 0,1 mg d'agoniste du GnRH (DECAPEPTYL[®]) à partir du 2^{ème} jour du cycle pendant 15 jours, la désensibilisation pituitaire complète étant confirmée par un dosage d'oestradiol bas (<50 pg/mL) et une échographie montrant l'absence de follicule supérieur à 10 mm et de kyste ovarien. Toutes les patientes ont bénéficié d'un bilan hormonal complet comprenant les différents dosages décrits précédemment. Pour chaque patiente étudiée, l'hormone anti-Müllerienne a été dosée sur un prélèvement réalisé à J0 de la stimulation par gonadotrophines.

Le monitoring du cycle s'est fait selon les critères échographiques et hormonaux habituels.

Le tableau V reprend les principales caractéristiques des femmes suivies dans cette étude.

Âge (ans)		30,2 (22-40)
Durée d'infertilité (ans)		3,7 (1-11)
Infertilité	Primaire	54 (78,3 %)
	Primo-secondaire	9 (13 %)
	Secondaire	6 (8,7 %)
Première tentative		64 (92,8 %)
Rang de la stimulation		1,7 (1-6)
ICSI / FIV		49 (71 %) / 20 (29%)
BMI (kg/m ²)	[20-25]	25,8

Tableau V : Principales caractéristiques des 69 patientes suivies dans notre étude.

II – MATERIELS ET METHODES

Les échantillons de sang sont obtenus par ponction veineuse franche au pli du coude sur tube sans anticoagulant. Le sérum récupéré après centrifugation rapide (dans les deux heures) est aliquoté en deux fractions de 500 µL puis congelé rapidement à -80°C. Les deux techniques ont été testées en parallèle, le même jour, dans les mêmes conditions. Chaque sérum a été testé en double pour chaque technique.

A - Principe du dosage

Le dosage de l'hormone anti-Müllerienne (AMH) fait appel à une technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) de type sandwich, dans laquelle se succèdent deux étapes :

- l'antigène (AMH) est capturé par des anticorps monoclonaux spécifiques fixés sur les parois des puits de microtitration.
- puis sont ajoutés successivement un second anticorps monoclonal biotinylé et le complexe streptavidine – peroxydase. Après incubation et lavage, le complexe antigénique lié aux puits est révélé par un substrat chromogène. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en AMH des échantillons.

B - Comparaison des kits de dosage DSL[®] et Immunotech[®]

Les principales caractéristiques des deux trousse de dosage de l'AMH sont reprises dans le tableau VI.

		DSL[®]	IMMUNOTECH[®]
Nature de l'échantillon		Sérum	Sérum, plasma EDTA ou plasma hépariné
Volume d'échantillon nécessaire		100 µL	25 µL
Domaine de mesure		0,025 – 15 µg/L	3-150 pM soit 0,41 – 21 µg/L
Limite de détection		0,017 µg/L	0,7 pM soit 0,1 µg/L
Sensibilité fonctionnelle		0,025 µg/L	0,40 µg/L
Précision	Intra-essai	CV < 5 %	CV < 12,3 %
	Inter-essai	CV < 8 %	CV < 14,2 %
Réactions croisées		ND	ND
Valeurs de référence chez la femme normale en âge de procréer (moyenne ± SD)		ND	2,0 ± 2,8 µg/L (Rey 2000)
présence d'un standard international		non	non
Durée de l'analyse		2 h 45 min	3 h 00

Tableau VI : Principales caractéristiques des deux kits de dosage de l'AMH.

(ND : non déterminé)

III – ANALYSE STATISTIQUE

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview F-4.5 (Abacus Concept, Berkeley, CA, USA). Le test de Spearman a été utilisé pour étudier les corrélations entre l'AMH et les différents paramètres étudiés (marqueurs de réponse ovarienne, caractéristiques physiques). Le test de Student apparié a été utilisé pour comparer les résultats obtenus par les deux techniques de dosage. Un test ANOVA a permis d'analyser les variances des différents groupes avant la réalisation d'un test de Dunnett pour l'analyse statistique des 3 groupes décrits page 60. Pour toutes les analyses, une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

RESULTATS

I – COMPARAISON DES DEUX TROUSSES

Les concentrations sériques d'Hormone Anti-Müllérienne obtenues avec les trousses DSL® et Immunotech® chez les 69 femmes de l'échantillon donnent les caractéristiques suivantes :

	Trousse DSL ®	Trousse Immunotech ®	<i>p</i>
Moyenne ± écart-type (µg/L)	0,79 ± 0,66	4,14 ± 2,93 µg/L	<0,0001
Médiane (µg/L)	0,59	3,34	

Tableau VII : Résultats des dosages de l'AMH sérique chez les 69 femmes de notre population.

L'étude de la corrélation entre les résultats donnés par les deux méthodes donne la droite de régression linéaire suivante :

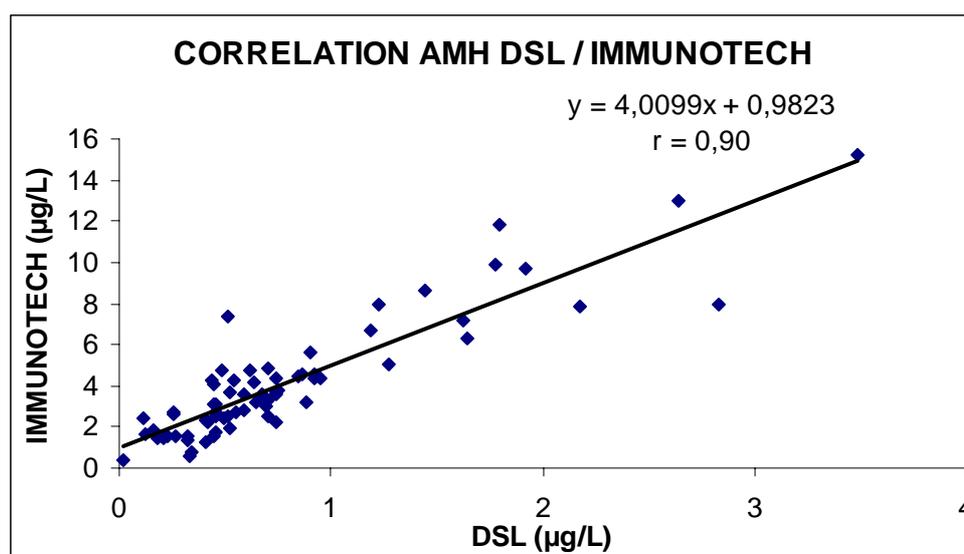


Figure 10 - Corrélation des résultats donnés par les deux trousses de dosage de l'AMH sérique.

On observe une corrélation relativement satisfaisante ($r = 0,90$) entre les deux trousses de dosage, mais il existe un écart très important dans les valeurs obtenues, avec une différence très significative ($p < 0,0001$). Les résultats donnés par la trousses Immunotech® sont en moyenne 4,7 fois supérieurs à ceux donnés par la trousses DSL®. Le seuil retenu par la littérature pour la prédiction de la réponse ovarienne est de 1 µg/L (Immunotech®). On constate que sur 69 femmes, seulement 3 ont une concentration sérique inférieure à 1 µg/L

lorsque l'on utilise la trousse Immunotech[®]. A l'inverse, 56 femmes présentent une concentration inférieure à ce seuil quand on utilise la trousse DSL[®]. L'interprétation du dosage pour l'évaluation de la réserve ovarienne et la détermination du pronostic d'une stimulation dépend donc de la technique utilisée et de son seuil.

II – EVALUATION DU DOSAGE DE L'AMH DANS LE CADRE D'UNE STIMULATION OVARIENNE

Les 69 patientes sélectionnées pour cette étude ont bénéficié d'une prise en charge standard dans le service de Médecine de la reproduction. Pour chacune de ces 69 patientes, l'étude du dossier clinique a permis de recueillir les paramètres suivants :

- l'âge
- le Body Mass Index (BMI), ou Index de masse corporelle (IMC)
- la durée approximative d'infertilité et son caractère primaire, primo-secondaire ou secondaire
- les résultats du bilan hormonal le plus récent avant la tentative
- la prise en charge en FIV conventionnelle ou en FIV ICSI
- les données relatives à la tentative de FIV en elle-même :
 - .le rang et l'ordre de la tentative
 - .l'oestradiol en fin de désensibilisation hypophysaire, dosé sur le même prélèvement que l'AMH (J0 de la stimulation par gonadotrophines)
 - .la durée de la stimulation ovarienne et le nombre d'unités de gonadotrophines utilisées
 - .le nombre d'ovocytes matures et atrétiques ponctionnés
 - .le nombre d'ovocytes matures injectés ou inséminés
 - .le nombre et la qualité des embryons obtenus
 - .le nombre d'embryons transférés et le jour du transfert
 - .la réalisation ou non d'une congélation embryonnaire
 - .et enfin le début ou non d'une grossesse (β hCG positif), et son évolutivité objectivée par une échographie à 7 semaines de grossesse.

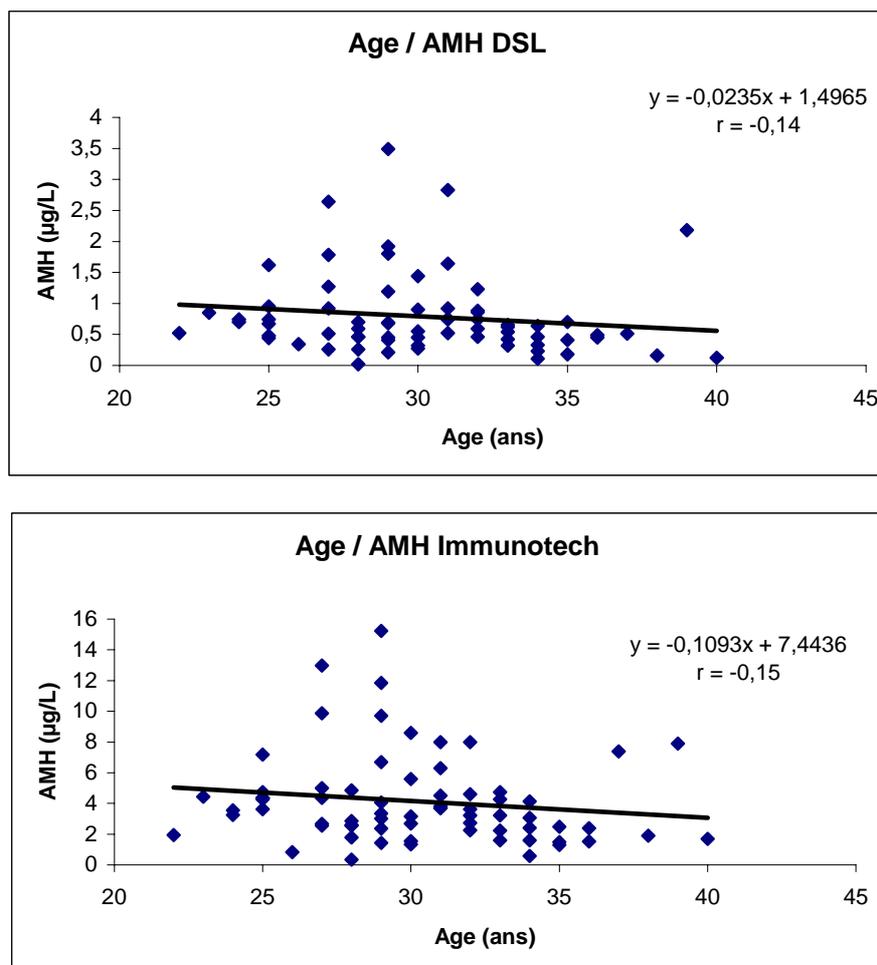
Nous allons évaluer le lien éventuel existant entre la concentration sérique d'AMH et ces différents critères.

A - AMH ET CARACTERISTIQUES PHYSIQUES

1 - Etude de la corrélation de l'AMH sérique avec l'âge

L'ensemble des études épidémiologiques montre une diminution progressive de la fertilité féminine à partir de l'âge de 30 ans, avec une nette accélération de cette diminution à partir de 35 ans. Cependant, des inégalités apparaissent, et de nombreux auteurs préfèrent mettre en avant l'âge « biologique », reflété par le statut ovarien, plutôt que l'âge chronologique des femmes.

Les figures 11A et 11B représentent la répartition de la concentration de l'AMH sérique en fonction de l'âge des patientes.



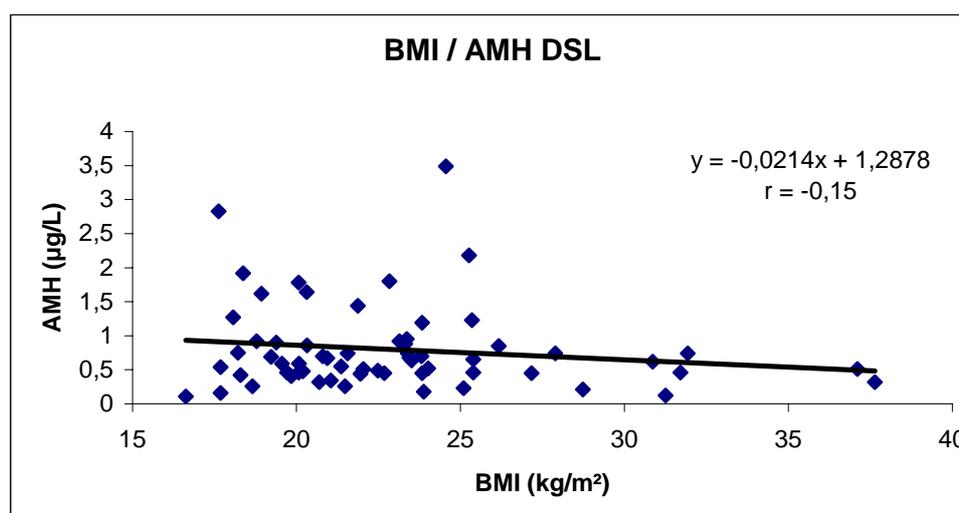
Figures 11A et 11B - Répartition de la concentration de l'AMH sérique en fonction de l'âge des patientes.

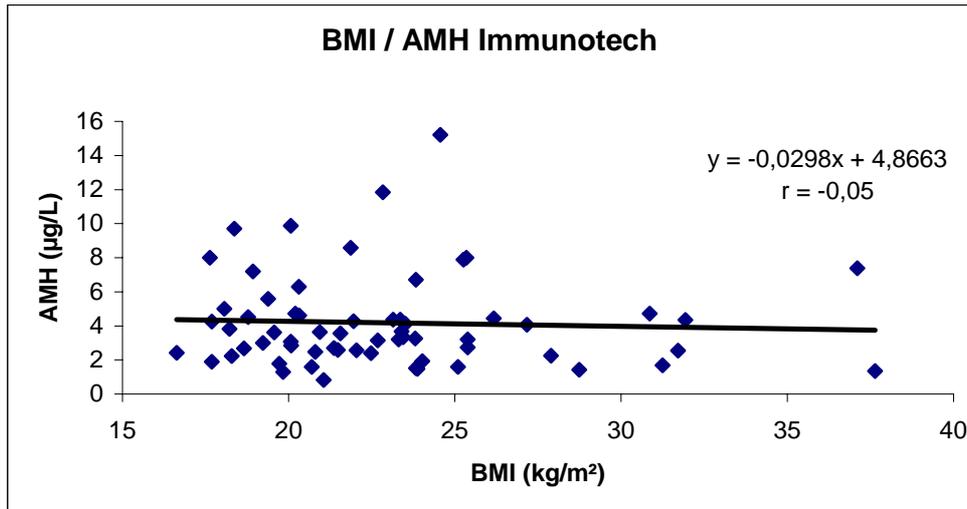
Les pentes des droites de régression sont toutes les deux négatives, et confirment la décroissance de la concentration circulante d'AMH sérique avec l'âge. Cependant, on observe une dispersion très importante des concentrations, comprises respectivement entre 0,02 et 3,49 $\mu\text{g/L}$ pour la trousse DSL[®], et entre 0,34 et 15,22 $\mu\text{g/L}$ pour la trousse Immunotech[®]. Ces résultats confirment l'existence d'une corrélation négative entre l'âge chronologique et le taux sérique d'AMH, même si le coefficient de corrélation obtenu est très faible. Ceci peut s'expliquer par le faible nombre de patientes d'âge supérieur à 35 ans ($n=6$), chez qui la réserve ovarienne diminue plus rapidement. Il faudrait donc étudier une population comprenant plus de femmes de plus de 35 ans pour pouvoir conclure de façon plus pertinente sur la corrélation entre âge et AMH sérique.

Il n'existe pas de différence significative entre les deux trousses. La dispersion très importante des concentrations en AMH permet d'affirmer que l'âge chronologique n'est pas un bon marqueur de la réserve ovarienne, ce qu'on retrouve fréquemment en pratique avec des disparités importantes de statut ovarien chez des femmes de même âge.

2 - Etude de corrélation avec l'index de masse corporelle

L'index de masse corporelle (ou BMI) a été calculé ($\text{poids} / \text{taille}^2$) pour l'ensemble des patientes. Les figures 12A et 12B présentent la répartition des concentrations sériques en fonction du BMI.





Figures 12A et 12B - Répartition des concentrations sériques d'AMH en fonction du BMI

Le diagramme de dispersion montre une très faible corrélation négative. Dans notre population, l'index de masse corporelle ne semble pas influencer la concentration circulante en AMH. Cette interprétation peut être faite quelle que soit la trousse utilisée.

L'AMH n'est donc pas corrélée aux paramètres physiques que sont l'âge et le poids. Ceci rend nécessaire l'étude de la corrélation de l'AMH avec les paramètres directement liés à la réponse ovarienne, et donc à la réserve ovarienne.

B – Concentration circulante en AMH et réponse ovarienne

Lors d'un cycle d'hyperstimulation ovarienne en vue d'une FIV, l'objectif est d'obtenir un grand nombre d'ovocytes fécondables afin d'augmenter le nombre d'embryons obtenus et optimiser ainsi les chances de grossesse.

Le protocole de stimulation ovarienne est adapté en fonction du monitoring échographique et biologique de la patiente qui permet de suivre la réponse ovarienne à la stimulation.

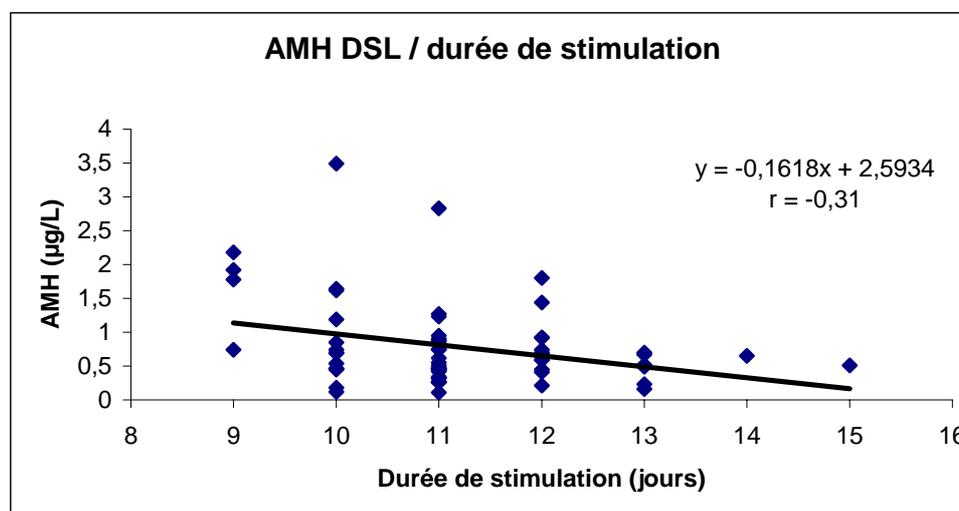
Cette réponse ovarienne peut être évaluée a posteriori selon différents critères recueillis en fin de cycle. Leur corrélation avec l'AMH a été évaluée afin de déterminer si la concentration sérique d'AMH à J0 de la stimulation par les gonadotrophines a une valeur prédictive sur la réponse ovarienne.

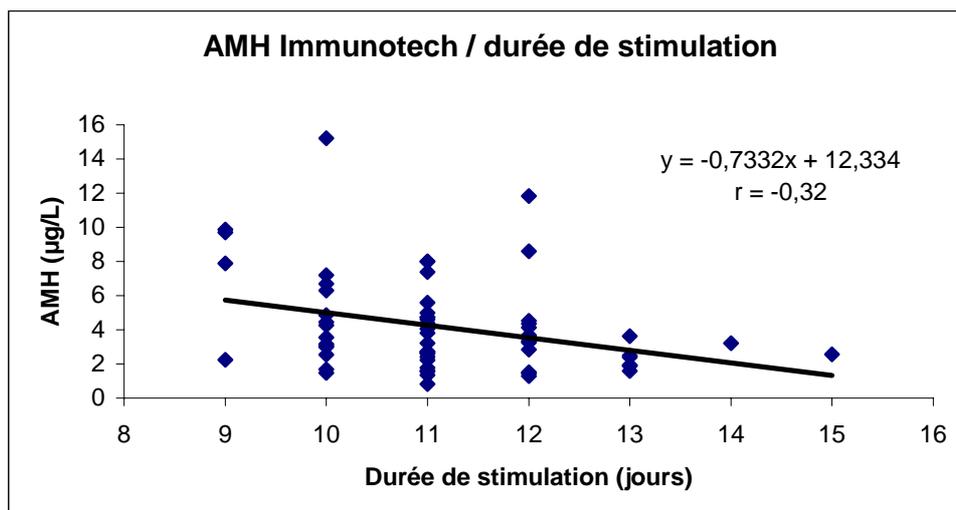
1- Concentration en AMH et caractères de la stimulation ovarienne

a) Durée de la stimulation

La durée de la stimulation par les gonadotrophines et la dose totale utilisée reflètent indirectement la réponse ovarienne. Une bonne réponse ovarienne à la stimulation est en effet généralement liée à un raccourcissement de la durée de stimulation et à une consommation moindre de gonadotrophines.

Les figures 13A et 13B représentent la dispersion de la concentration sérique d'AMH en fonction de la durée de stimulation.





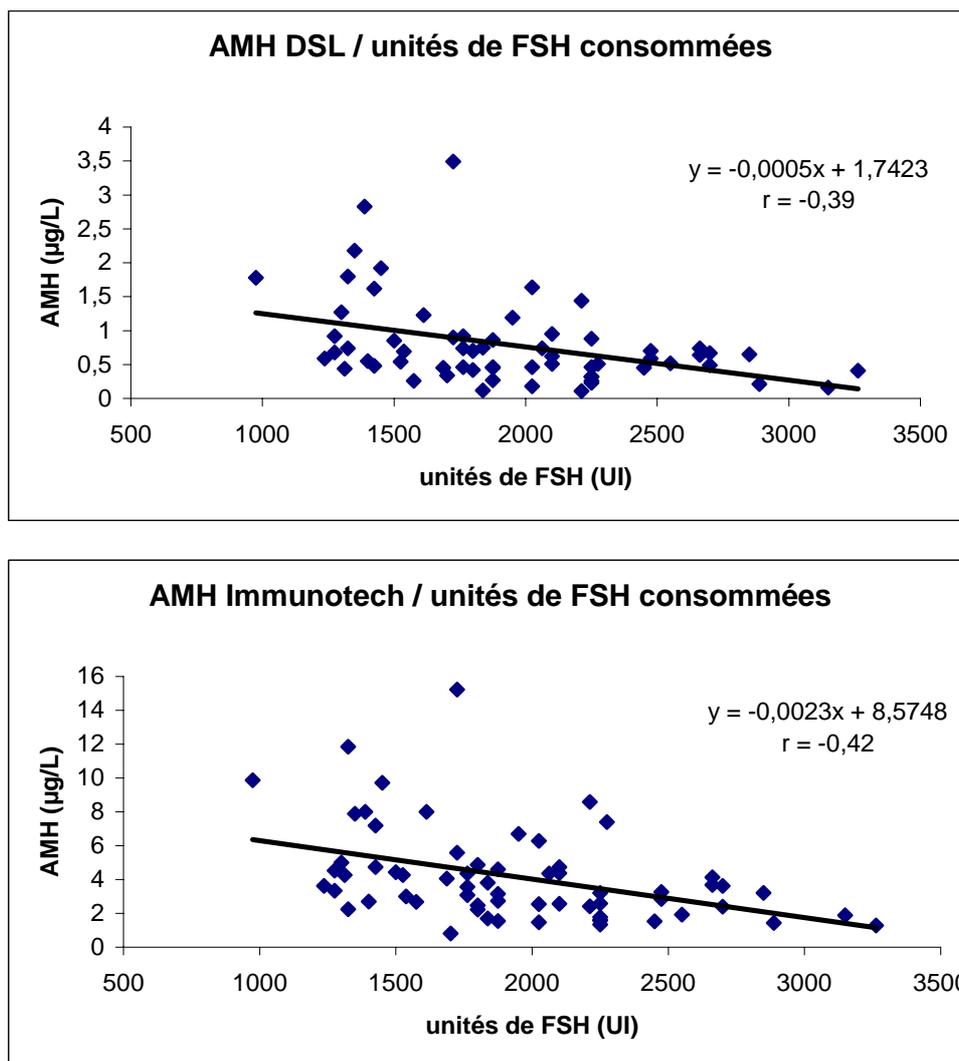
Figures 13A et B - Répartition de la concentration sérique d'AMH en fonction de la durée de stimulation.

Les pentes des droites de régression linéaire sont toutes les deux négatives. On retrouve une corrélation négative entre l'AMH sérique et la durée de stimulation. Le coefficient de corrélation r est équivalent pour les deux trousse de dosage (DSL[®] : $r = -0,31$ versus $r = -0,32$ pour Immunotech[®]). Une concentration sérique d'AMH basse fait donc craindre une stimulation ovarienne longue. Cependant, la durée d'une stimulation n'est pas à lui seul un critère décisionnel pour la poursuite ou l'interruption de la stimulation.

b) Dose de gonadotrophines utilisée

La dose totale de gonadotrophines utilisée lors de la stimulation est également un reflet indirect de la réponse ovarienne et est à mettre en lien avec la durée de stimulation.

Les figures 14A et B représentent la dispersion de la concentration sérique d'AMH en fonction du nombre d'unités de gonadotrophines consommées.



Figures 14 A et B - Répartition de la concentration sérique d'AMH en fonction du nombre d'unités de gonadotrophines consommées.

On observe pour ce critère une pente négative, tout comme pour la durée de stimulation. On retrouve en effet une corrélation négative entre l'AMH sérique à J0 de la stimulation et le nombre d'unités de gonadotrophines consommé. Les coefficients de corrélation r obtenus sont équivalents pour les deux trousse testées (DSL[®] : $r = -0,39$ DSL et $r = -0,42$ Immunotech[®]).

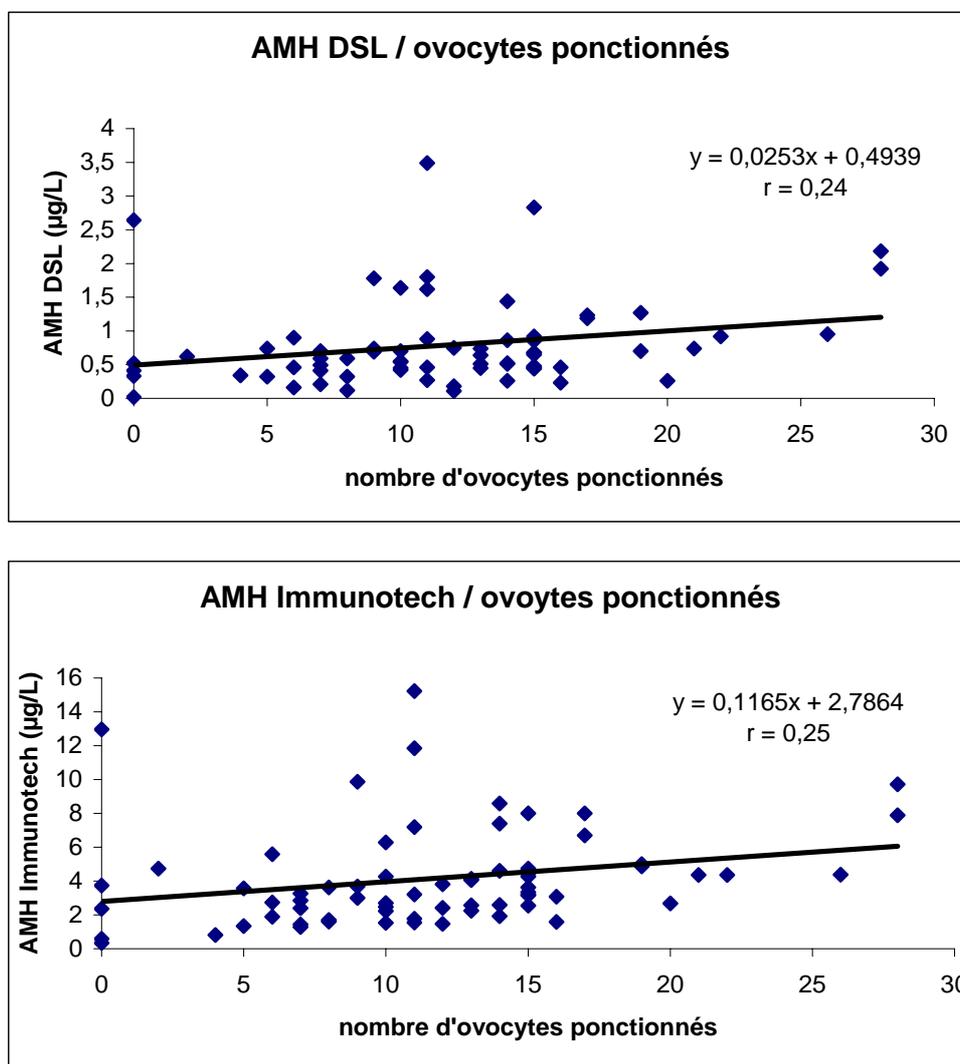
Une AMH sérique basse en début de stimulation peut donc être associée à une durée de stimulation plus longue et une consommation de gonadotrophines plus importante, ce qui peut permettre l'adaptation précoce du protocole de stimulation.

2 - AMH sérique et résultat de la stimulation ovarienne

Le principal élément d'estimation de la réponse ovarienne est le nombre d'ovocytes ponctionnés en fin de stimulation, 36 heures après le déclenchement par injection d'hCG. Ce nombre représente directement la réponse ovarienne quantitative à la stimulation.

L'étude de la corrélation avec l'AMH sérique en début de stimulation permet d'évaluer l'apport de ce dosage en terme de prédiction de la réponse ovarienne.

Les figures 15A et B représentent la dispersion de la concentration sérique d'AMH en fonction du nombre d'ovocytes ponctionnés.



Figures 15A et B - Répartition de l'AMH sérique en fonction du nombre d'ovocytes ponctionnés.

La pente de la droite de régression linéaire confirme le lien existant entre AMH sérique et la réponse ovarienne. Le coefficient de corrélation obtenu est équivalent pour les deux trousse de dosage.

Parmi les 69 patientes de cette population, 5 ont vu leur cycle de stimulation ovarienne arrêté avant le déclenchement de l'ovulation, 4 pour défaut de réponse ou de suivi du traitement, 1 pour hyperstimulation ovarienne. Pour ces 5 patientes, on a donc considéré dans le graphique précédent que le nombre d'ovocytes ponctionnés était nul. Cependant, la stimulation n'étant pas allée à son terme, on peut légitimement considérer que ces patientes peuvent être exclues de l'étude du nombre d'ovocytes ponctionnés et doivent plutôt permettre de déterminer si le taux d'AMH en début de stimulation peut prédire un arrêt du cycle de stimulation. L'exclusion des 5 patientes arrêtées pendant leur cycle de stimulation améliore sensiblement le coefficient de corrélation entre l'AMH et le nombre d'ovocytes ponctionnés (DSL[®] : $r = 0,236$ versus $r = 0,30$ et Immunotech[®] : $r = 0,244$ versus $r = 0,31$). Parmi ces 5 patientes, une présentait un syndrome des ovaires polykystique, deux une mauvaise compliance au traitement, enfin les deux dernières présentaient un défaut de réponse ovarienne. Il est à noter que leurs concentrations en AMH circulante avec la trousse Immunotech[®] étaient respectivement de 0,34 et 0,59 $\mu\text{g/L}$.

3 – AMH sérique et maturité ovocytaire

Le nombre d'ovocytes ponctionnés constitue un critère essentiel, mais la maturité ovocytaire est également un élément fondamental. L'étude du nombre d'ovocytes matures effectivement inséminés ou micro-injectés permet de s'affranchir de l'atrésie ou de l'immaturité de certains ovocytes ponctionnés, et tient compte ainsi indirectement de la maturité et de la qualité ovocytaires. L'étude de corrélation entre l'AMH sérique et le nombre d'ovocytes matures effectivement inséminés ou micro-injectés est ainsi meilleure qu'avec le nombre total d'ovocytes ponctionnés (DSL[®] : $r = 0,33$ versus $r = 0,30$ et Immunotech[®] : $r = 0,36$ versus $r = 0,31$). L'AMH reflète donc partiellement la qualité et la maturité ovocytaires, et non pas seulement l'aspect quantitatif de la réponse ovarienne à la stimulation.

4 – FSH, oestradiol et réponse ovarienne

Pour chaque patiente, un bilan hormonal complet comprenant notamment la FSH et l'oestradiol a été réalisé lors d'un cycle précédent non stimulé. Il est évident que la FSH et l'oestradiol ne peuvent pas être évalués à J0 du cycle de stimulation du fait du traitement freinateur par agoniste du récepteur du GnRH. Dans notre étude, nous avons pu récupérer pour la majorité des patientes le résultat des derniers dosages de FSH et d'oestradiol réalisés. Ces dosages n'étaient donc pas réalisés sur le même cycle que l'AMH, mais sur un cycle spontané antérieur, généralement datant de quelques mois et jamais au-delà de 18 mois. Nous avons donc réalisé deux études de corrélation entre ces deux critères traditionnels et le nombre d'ovocytes matures. La figure 16 représente la dispersion de la concentration en FSH et oestradiol en fonction du nombre d'ovocytes matures inséminés et/ou injectés.

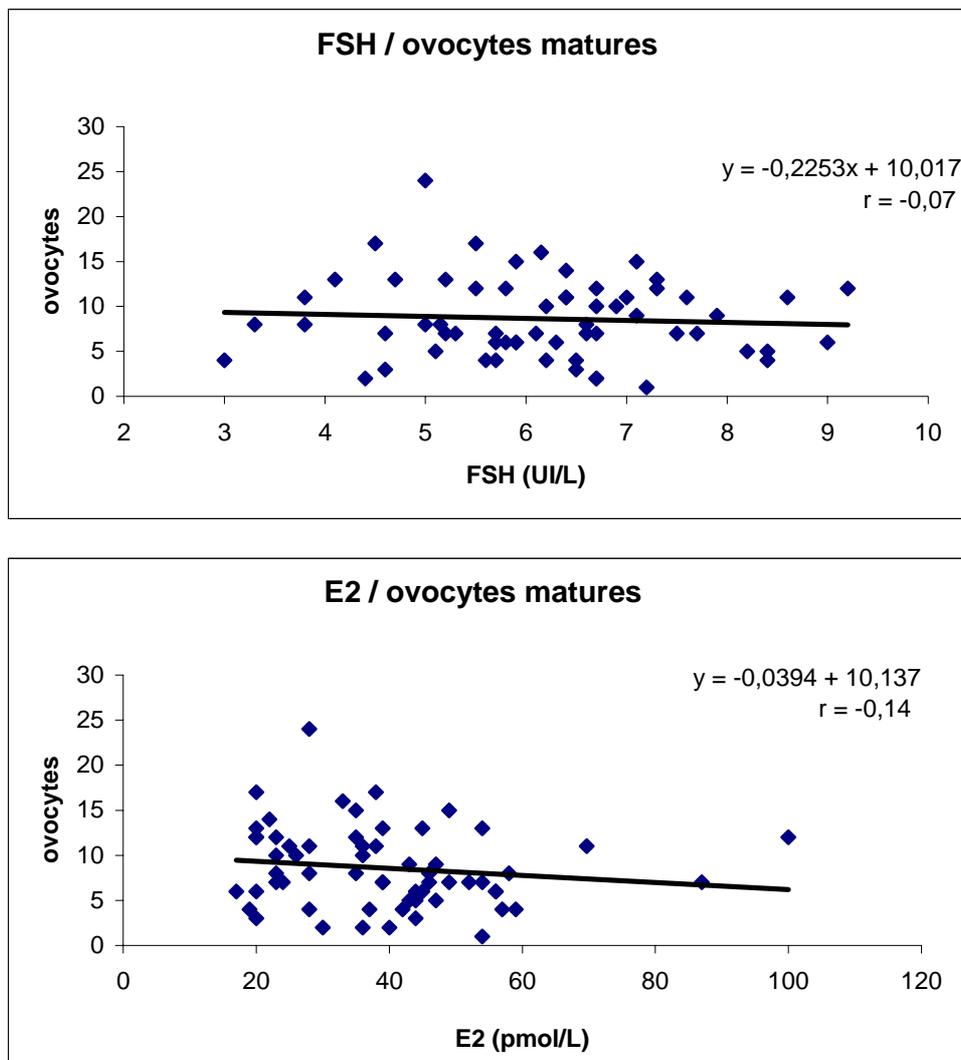


Figure 16 - Répartition de la FSH et de l'oestradiol en fonction du nombre d'ovocytes.

On observe une quasi absence de corrélation entre la FSH ou l'oestradiol et le nombre d'ovocytes matures inséminés. La corrélation de l'AMH (dosée à J0 de la stimulation) avec le nombre d'ovocytes est significativement plus forte que celle de la FSH ($p=0,01$) et celle de l'oestradiol ($p=0,005$) dosés à J3 d'un cycle non stimulé. Notre étude suggère donc fortement la supériorité de l'AMH sérique dans la prédiction de la réponse ovarienne. L'étude de la corrélation entre la FSH et l'AMH sériques dans notre population ne présente pas d'intérêt du fait de la sélection des patientes dans un protocole long demi-dose réservé aux patientes théoriquement bonnes répondeuses. La concentration moyenne en FSH chez ces patientes est effectivement de $6,1 \pm 1,3$ UI/L, ce qui confirme l'homogénéité de la population. Ainsi, la dispersion des valeurs est probablement insuffisante pour permettre une étude correcte de la corrélation entre FSH et nombre d'ovocytes.

Cependant, de nombreux articles retrouvent une corrélation entre la FSH et l'AMH réalisée conjointement lors du bilan hormonal standard à J3 d'un cycle non stimulé. (Seifer, MacLaughlin *et al.* 2002; van Rooij, Broekmans *et al.* 2002; Fanchin, Schonauer *et al.* 2003; Muttukrishna, Suharjono *et al.* 2004).

Lorsque l'on compare les trois paramètres testés, on constate que l'AMH sérique est le paramètre le plus pertinent si l'on considère la réponse ovarienne, c'est-à-dire le nombre d'ovocytes ponctionnés et la qualité ovocytaire. Nous avons donc arbitrairement séparé les patientes en 3 catégories selon des critères empiriques pouvant être utilisés au laboratoire de biologie de la reproduction. On considère les catégories suivantes :

- 1) une « bonne » réponse ovarienne lorsque l'on obtient plus de 10 ovocytes ponctionnés et/ou plus de 10 ovocytes inséminés ou injectés.
- 2) une réponse ovarienne « moyenne » ou « intermédiaire » lorsqu'on obtient entre 6 et 9 ovocytes ponctionnés et/ou ovocytes inséminés.
- 3) une réponse ovarienne « insuffisante » lorsque l'on obtient moins de 6 ovocytes ponctionnés et/ou 3 ovocytes inséminés ou injectés.

La figure 17 présente la concentration sérique en AMH (Immunotech®) dans les trois populations, ainsi que la moyenne.

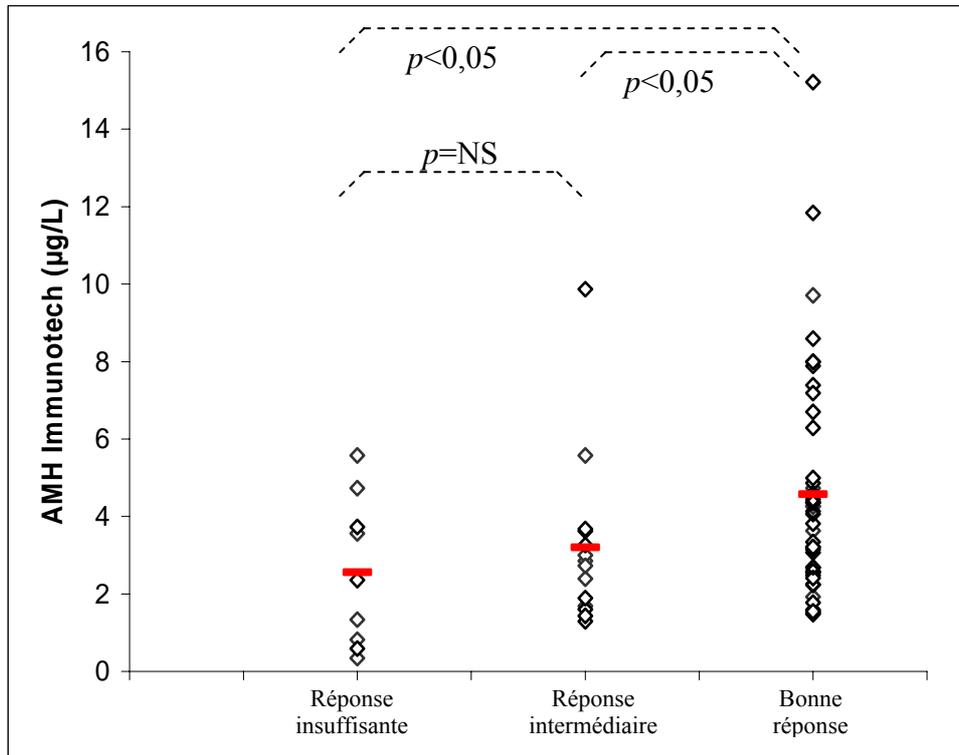


Figure 17 – Répartition de l’AMH sérique et moyenne dans les 3 groupes.

On constate qu’il existe une différence significative ($p < 0,05$) entre les « bonnes » répondeuses et les répondeuses « intermédiaires » d’une part, et surtout entre les « bonnes » répondeuses et les répondeuses « insuffisantes » d’autre part.

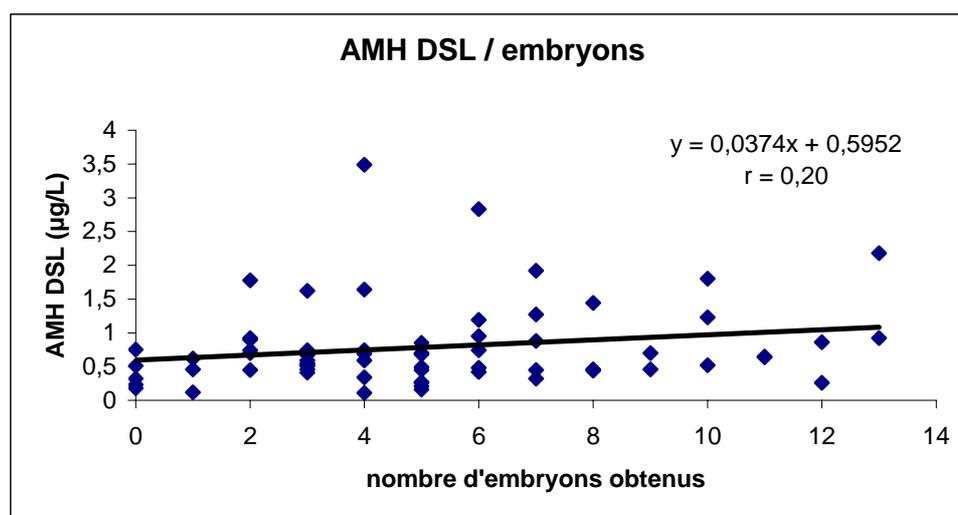
Cette analyse statistique n’a pas été faite pour la FSH et l’oestradiol, étant donné la sélection de nos patientes, dont l’âge moyen est de 30,2 ans et dont la concentration moyenne en FSH est homogène et normale ($6,1 \pm 1,3$ UI/L).

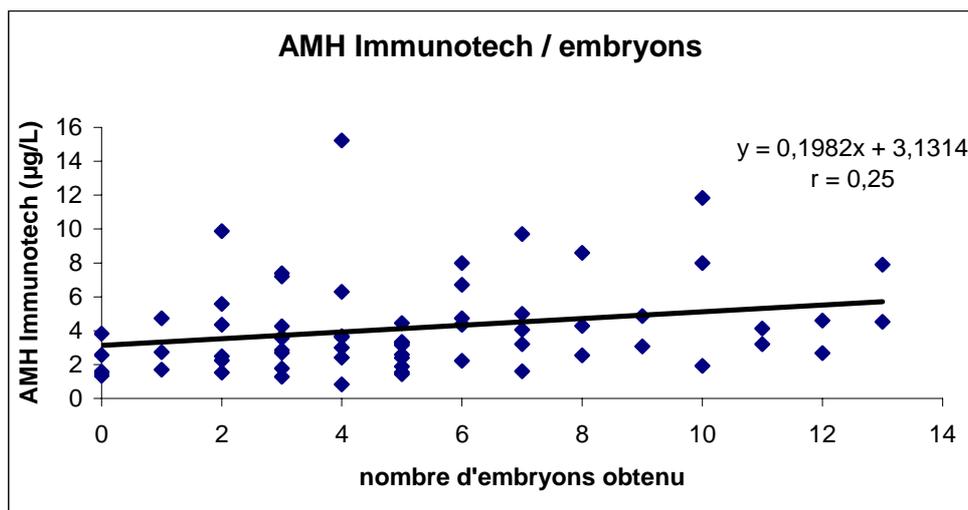
C – AMH sérique et issue de la FIV

A l'issue de la stimulation et de la ponction ovocytaire, l'objectif est l'obtention d'embryons et enfin l'initiation d'une grossesse. Ceci ne concerne plus les ovaires seuls puisque la qualité du spermatozoïde fécondant est également fondamentale dans la fécondation et l'obtention d'embryons viables et de bonne qualité, seuls pouvant donner lieu à l'initiation d'une grossesse. De plus, les facteurs utérins (réceptivité, vascularisation de l'endomètre) interviennent également lors de l'implantation de l'embryon. La corrélation de l'AMH avec l'issue de la FIV n'est donc plus directe, mais fait intervenir des paramètres extérieurs supplémentaires. Nous allons donc nous intéresser à la corrélation de l'AMH sérique avec les différents paramètres liés à la fécondation et à l'implantation.

1 – AMH sérique et nombre d'embryons

Le premier élément permettant d'évaluer le succès de la stimulation est l'obtention d'embryons, signe d'une fécondation *in vitro* réussie. Ces embryons peuvent être transférés après 48 ou 72 heures de culture selon leur développement. Nous avons exclu les 5 patientes qui ne sont pas allées au terme de leur stimulation. Les figures 18A et B représentent la dispersion de l'AMH sérique en fonction du nombre total d'embryons obtenus.





Figures 18A et B - Répartition de l'AMH sérique en fonction du nombre total d'embryons obtenus.

Si l'on considère seulement la pente de la droite de régression, il semble exister un lien entre l'AMH sérique et le nombre d'embryons obtenus. Cependant, on constate une dispersion importante des valeurs de part et d'autre de la droite de régression, et on retrouve ainsi un coefficient de corrélation médiocre et inférieur à celui obtenu avec le nombre d'ovocytes ponctionnés (DSL[®] : $r = 0,17$ versus $0,30$ et Immunotech[®] : $r = 0,21$ versus $0,31$, $p=0,82$). L'AMH sérique est donc moins liée au nombre d'embryons obtenus qu'au nombre d'ovocytes ponctionnés. Comme on l'a dit précédemment, ceci peut s'expliquer par l'intervention d'un biais important lié à la qualité du spermatozoïde dans la réussite de la fécondation et qui n'est pas pris en compte ici.

2 – AMH sérique et taux de fécondation

Il est classique au laboratoire de s'intéresser au taux de fécondation à l'issue de la stimulation, lors de la fécondation in vitro proprement dite. Le taux de fécondation correspond au ratio du nombre d'embryons sur le nombre d'ovocytes inséminés ou micro-injectés. De la même façon que le nombre d'embryons, le taux de fécondation dépend fortement des facteurs spermatiques, de la qualité du spermatozoïde fécondant, et pas seulement des facteurs ovariens. Il existe donc un biais énorme dans l'étude de la corrélation du taux de fécondation et de l'AMH, facteur strictement lié aux ovaires. Dans notre population, l'étude statistique ne montre aucune corrélation entre l'AMH et le taux de

fécondation, quelle que soit la trousse ($r = -0,04$). Ceci semble montrer que le statut ovarien n'influence pas la fécondabilité des ovocytes obtenus.

Si l'on étudie l'importance du facteur spermatique dans le taux de fécondation et le pourcentage de grossesses obtenus en comparant les cycles de FIV, avec a priori des spermatozoïdes normaux, et les cycles de FIV-ICSI, avec potentiellement des altérations plus ou moins sévères du spermogramme, on montre que les taux de fécondation sont identiques en FIV et en ICSI. De plus, on observe un taux de grossesse supérieur en ICSI par rapport à la FIV conventionnelle. Ceci est à nuancer du fait du passage en ICSI de patients ayant des altérations parfois très modérées du spermogramme, et de patients avec un spermogramme normal mais ayant subi des échecs en FIV conventionnelle. Ces résultats permettent de nuancer l'hypothèse évoquée précédemment selon laquelle les moins bons coefficients de corrélation obtenus en étudiant le nombre d'embryons par rapport au nombre d'ovocytes sont dus à l'introduction d'un biais correspondant aux facteurs spermatiques.

3 – AMH sérique et qualité embryonnaire

Après avoir étudié la quantité d'embryons obtenus, nous nous sommes intéressés à leur qualité. Il n'existe pas de méthode universelle de cotation de la qualité embryonnaire, l'estimation est simplement visuelle et décrit grossièrement le nombre, l'intégrité et la régularité des cellules embryonnaires. Cette estimation est donc largement subjective. Cependant, on peut estimer que des opérateurs entraînés repèrent facilement les embryons de qualité « idéale », c'est-à-dire les embryons possédant 4 cellules régulières, non fragmentés, après 48 heures de culture (J2). Un moyen indirect d'estimer la qualité embryonnaire est donc de calculer la proportion de ces embryons de bonne qualité parmi l'ensemble des embryons obtenus à J2. La corrélation entre l'AMH à J0 de la stimulation et la qualité embryonnaire (DSL[®] : $r = 0,15$, Immunotech[®] : $r = 0,07$) apparaît plutôt faible.

4 – AMH sérique et grossesse

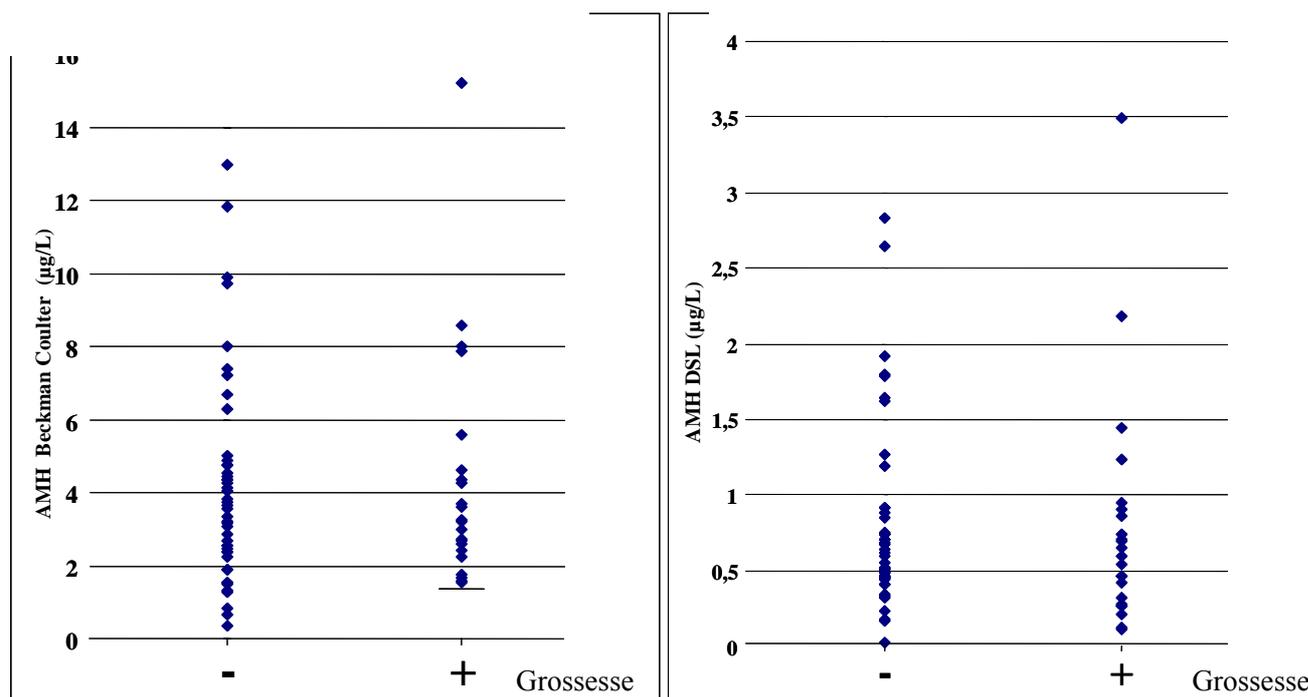
Enfin, le critère final de réussite du cycle de stimulation est l'initiation d'une grossesse, détectée par un dosage de β hCG positif 2 semaines après le transfert embryonnaire. On s'intéresse d'une part à la détection biochimique du début de grossesse, puis à l'existence d'une grossesse évolutive constatée lors de la première échographie réalisée à la septième semaine de grossesse. Dans notre cohorte, l'initiation d'une grossesse a été constatée chez 23 patientes (33% de réussite), et les données recueillies chez 21 de ces patientes ont confirmé 17 grossesses évolutives et 4 fausses couches.

Les caractéristiques des deux groupes de patientes sont regroupées dans le tableau suivant :

	Femmes enceintes (n=23)	Femmes non enceintes (n=46)	<i>P</i>
Age (ans)	31,7 ± 3,7	29,9 ± 4,0	0,07
BMI (kg/m ²)	22,3 ± 3,7	23,0 ± 4,8	NS
FSH (UI/L)	6,16 ± 1,7	6,12 ± 1,18	NS
AMH DSL (µg/L)	0,78 ± 0,76	0,80 ± 0,61	NS
AMH Immunotech (µg/L)	4,17 ± 3,18	4,15 ± 2,88	NS
dose totale de gonadotrophines (U)	999,6 ± 452,2	1925,4 ± 554,3	<0,0001
durée de la stimulation (jours)	11,1 ± 1,0	11,22 ± 1,31	NS
Ovocytes ponctionnés	12,2 ± 5,9	11,25 ± 6,26	NS

Tableau VIII : Caractéristiques des femmes enceintes et non enceintes à l'issue du cycle de FIV.

On ne retrouve pas de différence significative entre les deux groupes, excepté pour la dose totale de gonadotrophines qui est inférieure chez les patientes enceintes. Ceci est à mettre en lien avec la réponse ovarienne. En effet, on peut considérer que les patientes enceintes ont eu une meilleure réponse ovarienne et donc une consommation de FSH moindre. Il n'existe pas de différence pour l'AMH, quelle que soit la trousse de dosage. Cependant, l'étude de la corrélation entre l'AMH et l'obtention d'une grossesse a surtout pour but d'essayer de déterminer un seuil en-dessous duquel les chances de grossesse sont faibles. Les figures 19 représentent la répartition des valeurs d'AMH sérique dans les deux groupes de patientes.



Figures 19A et B - Répartition de l'AMH sérique en fonction de l'initiation ou non d'une grossesse.

L'analyse des résultats obtenus avec la trousse Immunotech[®] montre que toutes les femmes enceintes (n=23) ont une AMH en début de stimulation supérieure à 1,4 µg/L. Seules 3 des 46 femmes non enceintes ont une AMH inférieure à 1,4 µg/L avec la trousse Immunotech[®]. Deux de ces trois femmes ont vu leur cycle de stimulation arrêté avant la ponction ovocytaire pour réponse ovarienne insuffisante. Malgré la faiblesse importante de l'effectif, on peut calculer les valeurs suivantes :

- valeur prédictive positive d'une AMH > 1,40 µg/L = 36%
- valeur prédictive négative d'une AMH < 1,40 µg/L = 100%

Il semblerait donc qu'une concentration d'AMH sérique inférieure à 1,40 µg/L avec la trousse Immunotech[®] à J0 de la stimulation soit de mauvais pronostic pour l'obtention d'une grossesse.

Concernant les résultats obtenus avec la trousse DSL[®], on constate que dans le groupe des femmes enceintes (n=23), on retrouve des taux d'AMH allant de 0.11 à 2.18 µg/L, c'est-à-dire recouvrant quasiment l'ensemble du domaine de mesure de la trousse. En considérant un seuil pour la trousse DSL[®] approximativement 4 fois moins élevé, soit 0,35 µg/L, on

montre que 7 des 23 femmes enceintes et 7 des 46 femmes non enceintes ont une AMH sérique inférieure à ce seuil, soit une valeur prédictive positive de 29% et une valeur prédictive positive de 50%. Il ne semble donc pas exister de seuil prédictif pour l'obtention d'une grossesse avec la trousse DSL[®].

5 – AMH sérique et évolutivité de la grossesse

Enfin, il est proposé aux patientes enceintes suite à leur cycle de FIV d'effectuer une échographie de contrôle à 7 semaines d'aménorrhée. La grande majorité des patientes viennent la réaliser dans le service de Médecine de la reproduction du CHU de Nantes, ce qui permet de vérifier l'évolutivité de la grossesse.

Nous avons pu recueillir ce suivi pour 21 des 23 femmes enceintes de notre étude. Le début de la grossesse se passait sans problème pour 17 de ces 21 femmes. Par contre, 4 femmes avaient informé le service de l'arrêt spontané de la grossesse avec une fausse couche. Les résultats obtenus montrent qu'il ne semble pas exister de seuil permettant de prédire un risque de fausse couche plus élevé, même si le faible nombre de cas ne permet pas de réaliser une réelle étude statistique. Les concentrations d'AMH ne montrent pas de différence significative dans les deux groupes (grossesse évolutive et fausse couche), quel que soit le kit de dosage.

DISCUSSION

Nous rapportons ici l'étude comparative des deux trousse de dosage de l'AMH disponibles sur le marché, ainsi que l'étude de l'intérêt pronostique du dosage de l'AMH en début de stimulation ovarienne chez 69 femmes suivies pour fécondation *in vitro* dans le service de Médecine de la reproduction du CHU de Nantes.

I – ETUDE COMPARATIVE DES DEUX TROUSSES DE DOSAGE DE L'AMH

Les deux trousse de dosage de l'AMH disponibles sur le marché sont commercialisées par les sociétés DSL[®] et Immunotech[®] (Beckman Coulter). La première commercialisée a été la trousse Immunotech[®], dont la sensibilité analytique a été améliorée en 2000. Elles reposent toutes les deux sur le même principe ELISA de type sandwich en deux étapes successives. Les performances annoncées par les fournisseurs ont été détaillées précédemment (tableau VI). La comparaison des résultats fournis par les deux trousse nous a permis de mettre en évidence une disparité importante.

On peut noter tout d'abord que le dosage de l'AMH est caractérisé par l'absence de standard international. Les deux trousse utilisent donc des standards et/ou contrôles à base d'AMH recombinante, mais ceux-ci ne peuvent être validés par comparaison avec un standard international. Ceci explique en partie les disparités très importantes retrouvées entre les deux méthodes de dosage. En effet, chaque manipulation est validée en fonction des résultats obtenus pour les contrôles et/ou les standards, mais l'absence de standard commun aux deux méthodes empêche toute comparaison. Les trousse de dosage sont d'autre part réalisées à partir d'anticorps monoclonaux différents, sans que la confrontation à une référence soit possible. En effet, les épitopes reconnus par ces anticorps ne sont pas précisés dans les fiches de trousse. On observe cependant une très bonne corrélation entre les deux méthodes ($r = 0,90$), mais un décalage très important entre les résultats, avec des valeurs 4,7 fois supérieures en moyenne obtenus avec la trousse Immunotech[®] par rapport à la trousse DSL[®] (différence statistiquement significative, $p < 0.0001$). L'absence de standard international ne permet pas de déterminer quelle méthode est la plus proche des valeurs « réelles » d'AMH sériques.

Cette disparité très importante entre les deux méthodes rend donc indispensable l'indication de la trousse utilisée lors des dosages et lors de la détermination des valeurs de référence et des seuils. L'analyse de la littérature doit se faire en fonction de ce critère

essentiel. Tout changement de méthode par un laboratoire doit donc être expressément stipulé. Il est à noter que l'ensemble de la littérature disponible à ce jour sur l'AMH reprend des dosages réalisés à l'aide de la trousse Immunotech®.

L'analyse des performances mentionnées par les fournisseurs met en évidence une plus grande sensibilité analytique pour la trousse DSL® (0.017 µg/L versus 0.10 µg/L pour Immunotech®). Elle serait donc plus performante dans les valeurs basses d'AMH, et serait donc éventuellement intéressante en biologie de la reproduction, où une valeur basse évoque une altération de la réserve ovarienne et un pronostic péjoratif en fécondation *in vitro*. Cependant, les standards fournis avec cette trousse et permettant de construire la gamme de calibration ne recouvrent pas correctement cette zone de concentration basse, avec notamment un écart très important entre les standards D (concentration théorique 0.25 µg/L) et E (concentration théorique 1.5 µg/L). On retrouve également dans nos manipulations un problème de sensibilité et de reproductibilité pour les standards les plus bas, B (concentration théorique 0.025 µg/L) et C (0.1 µg/L), nécessitant parfois d'exclure le standard B pour construire une droite de calibration satisfaisante. Nous ne retrouvons donc pas dans notre expérience cette très bonne sensibilité théorique.

Ce problème de sensibilité dans les valeurs basses se retrouve également, mais dans une moindre mesure, avec la trousse Immunotech®. En effet, le point de gamme le plus bas (concentration théorique 3 pmol/L, soit environ 0,43 µg/L) pose également quelques problèmes de sensibilité et de reproductibilité, sans qu'il soit toutefois nécessaire de l'exclure pour la construction de la gamme. La répartition des autres points de la gamme est cohérente et recouvre bien la zone de dosage.

Cependant, ce problème de sensibilité dans les valeurs très basses n'a pas vraiment de conséquence au niveau clinique, l'interprétation du résultat se faisant plus par rapport à un seuil décisionnel (1 µg/L avec la trousse Immunotech® selon la littérature). Une valeur d'AMH inférieure à ce seuil fait donc craindre un échec, quelle que soit sa valeur exacte. D'autre part, si on applique le facteur de conversion 4 retrouvé dans notre étude, la sensibilité analytique de la trousse DSL® (0.017 µg/L) correspondrait à une valeur d'environ 0.07 µg/L avec la trousse Immunotech®, valeur proche de sa sensibilité analytique annoncée par le fournisseur (0.10 µg/L). Les deux trousses semblent donc assez proches au niveau sensibilité.

En conclusion, ces deux trousse sont bien corrélées, avec cependant des valeurs plus de quatre fois supérieures obtenues avec la trousse Immunotech[®] par rapport à la trousse DSL[®]. Ceci est principalement imputable à l'absence de standard international et rend indispensable la notification de la méthode utilisée lors de tout dosage. Il semble également que ces deux trousse aient des problèmes de sensibilité dans les valeurs basses, notamment la trousse DSL[®] pour laquelle le choix des standards de calibration semble mal adapté. Cependant, ce manque de sensibilité dans les valeurs basses est à nuancer en fonction de l'interprétation clinique du dosage de l'AMH.

II – AMH SERIQUE ET REPONSE OVARIENNE

L'AMH est sécrétée par les petits follicules antraux qui reflètent la réserve ovarienne, et constituent le pool de follicules pouvant être recrutés lors de la stimulation ovarienne. Plusieurs équipes se sont donc penchées sur l'intérêt prédictif de l'AMH circulante pour la réponse ovarienne lors d'une stimulation. L'existence d'un marqueur pronostique fiable et précoce pour la réponse ovarienne permettrait en effet d'adapter la stimulation en cours (doses, durée, type de protocole) et les stimulations suivantes. Notre étude évalue l'intérêt du dosage de l'AMH à J0 de la stimulation par les gonadotrophines comme marqueur prédictif de la réponse ovarienne. Pour cela, nous avons étudié la corrélation entre l'AMH et les différents marqueurs de la réponse ovarienne que sont la durée de stimulation, le nombre d'unités de FSH consommées, le nombre total d'ovocytes ponctionnés, le nombre d'ovocytes matures inséminés ou micro-injectés et la qualité ovocytaire. On obtient une bonne corrélation avec le nombre d'ovocytes ponctionnés qui représente seulement l'aspect quantitatif de la réponse ovarienne. La corrélation est meilleure avec le nombre d'ovocytes matures effectivement inséminés ou micro-injectés, ce qui tendrait à montrer que l'aspect qualitatif des ovocytes obtenus entre également en jeu dans l'évaluation de la réponse ovarienne par l'AMH. Si on utilise des critères arbitraires utilisés au laboratoire pour qualifier la réponse ovarienne, notre étude statistique a montré une différence significative ($p < 0,05$) entre des patientes présentant une réponse ovarienne « insuffisante » ou « intermédiaire » et des patientes avec une « bonne » réponse ovarienne. On constate cependant que la corrélation est mauvaise avec la qualité ovocytaire seule. D'autre part, la corrélation est bonne avec le nombre d'unités de gonadotrophines consommées. Dans le même temps, la FSH et l'oestradiol mesurés à J3 d'un cycle non stimulé sont beaucoup moins bien corrélés que l'AMH au nombre d'ovocytes inséminés. Ainsi, l'AMH dosée à J0 de la stimulation semble corrélée à l'association de l'aspect quantitatif et qualitatif de la réponse ovarienne et apparaît supérieure à la FSH et l'oestradiol. Pour l'ensemble des critères étudiés, la corrélation avec l'AMH est semblable quelle que soit la trousse de dosage considérée.

Ces résultats sont tout à fait en accords avec ceux retrouvés dans la littérature. Plusieurs équipes se sont intéressées à la détermination de l'intérêt prédictif de l'AMH dans la réponse ovarienne, et à sa comparaison avec les autres marqueurs habituellement utilisés. Dans une étude récente publiée en 2004, Hazout *et al* ont étudié l'intérêt du dosage de l'AMH à J3 d'un

cycle non stimulé comme marqueur pronostique de la réponse ovarienne et l'ont comparé aux autres marqueurs habituellement utilisés que sont l'âge, l'inhibine B, la FSH et l'oestradiol dosés également à J3. Le dosage de l'AMH était réalisé avec la trousse Immunotech[®]. Cette étude a été menée sur un échantillon homogène de 109 femmes (FSH < 12 UI/L, E2 < 50 pg/mL, inhibine B > 40 pg/mL). Elle retrouve une corrélation entre l'AMH et le nombre d'ovocytes matures ponctionnés avec un coefficient de corrélation $r = 0,38$, résultat concordant aux nôtres. L'AMH semble donc bien être un marqueur prédictif positif de la réponse ovarienne. D'autre part, l'étude de Hazout *et al.* montre que la corrélation de l'AMH avec les autres marqueurs pronostiques habituellement utilisés est mauvaise ($r = -0,08$ pour la corrélation AMH / FSH et $r = -0,09$ pour la corrélation AMH / âge), conclusion que nous retrouvons dans notre étude. De plus, la corrélation de ces marqueurs avec le nombre d'ovocytes ponctionnés est également mauvaise et remet en cause leur intérêt dans la prédiction de la réponse ovarienne ($r = 0$ pour la corrélation oestradiol / nombre d'ovocytes et $r = -0,12$ pour la corrélation FSH / nombre d'ovocytes). De la même façon, notre étude retrouve une mauvaise corrélation entre le nombre d'ovocytes recueillis et la FSH ou l'oestradiol. Ceci confirme la mauvaise corrélation entre l'AMH et les autres marqueurs dans un échantillon homogène de femmes ayant un bilan hormonal normal et surtout la supériorité de l'AMH comme facteur prédictif d'une réponse ovarienne satisfaisante. Enfin, nos résultats montrent que le dosage de l'AMH à J0 de la stimulation par les gonadotrophines est aussi intéressant dans la prédiction de la réponse ovarienne que son dosage à J3 d'un cycle non stimulé.

Dans une autre étude publiée en 2002 et menée chez 107 femmes suivies pour fécondation *in vitro*, l'équipe de Seifer *et al* a séparé deux groupes en fonction de la réponse ovarienne obtenue : les faibles répondeuses ($n=28$), avec 6 ovocytes ponctionnés ou moins, et les bonnes répondeuses ($n=79$), avec 11 ou plus d'ovocytes ponctionnés. Ils ne retrouvent pas de différence significative entre les deux groupes concernant l'âge et la maturité ovocytaire. Il existe par contre une différence significative pour l'oestradiol ($p = 0,003$), la FSH ($p=0,01$), et l'AMH ($p= 0,006$, trousse Immunotech[®]) dosés à J3. Les auteurs précisent que cette différence statistique n'a pas vraiment de signification clinique, les valeurs restant proches dans les deux groupes. La corrélation de l'AMH avec le nombre d'ovocytes matures ponctionnés donne un coefficient $r = 0,48$. Notre étude retrouve une corrélation légèrement moins bonne entre ces deux paramètres, même si cette comparaison est limitée du fait du nombre de cas différent et de la sélection différente de la population. Par contre, nous ne

retrouvons pas dans notre étude de différence significative entre les deux groupes pour la FSH et l'oestradiol (tableau 9). Ceci peut s'expliquer par le recrutement des patientes. Dans notre étude, les patientes sont dans l'ensemble jeunes, la majorité étant dans sa première tentative de FIV, et suivent toutes un protocole de stimulation long demi-dose : elles sont donc potentiellement bonnes répondeuses. L'homogénéité de notre cohorte est prouvée par les dosages de FSH à J3, avec une moyenne à 6.1 ± 1.3 UI/L. Les patientes de notre étude constituent donc un échantillon homogène de femmes théoriquement bonnes répondeuses avec un bilan hormonal normal, contrairement à l'étude de Seifer *et al*, dont le seul critère de sélection est une FSH à J3 inférieure à 10 UI/L, ce qui laisse place à plus de disparités entre les patientes. D'autre part, notre contingent de femmes ayant une faible réponse ovarienne (≤ 6 ovocytes) est très réduit, puisqu'il ne compte que 12 femmes, contre 28 dans l'étude de Seifer. A l'inverse, nous retrouvons une différence significative ($p=0.02$) entre les deux groupes concernant la maturité ovocytaire, supérieure chez les bonnes répondeuses. Ainsi, même si l'AMH n'est pas bien corrélée à la qualité ovocytaire seule comme nous l'avons montré ($r=0.08$ DSL[®] / $r=0.14$ Immunotech[®]), il semble que les patientes bonnes répondeuses aient une meilleure maturité ovocytaire. Au final, l'AMH est bien le meilleur marqueur hormonal prédictif de réponse ovarienne. Le tableau IX reprend les critères de classification de l'équipe de Seifer.

	« Faibles répondeuses » ≤ 6 ovocytes (n=12)	« Bonnes répondeuses » ≥ 11 ovocytes (n=40)	<i>p</i>
âge	$30,2 \pm 3,8$	$29,5 \pm 3,8$	NS
FSH (UI/L)	$6,25 \pm 1,2$	$6,0 \pm 1,3$	NS
E ₂ (pmol/L)	$38,7 \pm 10,4$	$36,3 \pm 16,5$	NS
AMH DSL ($\mu\text{g/L}$)	$0,62 \pm 0,68$	$0,90 \pm 0,72$	0,23
AMH Immunotech ($\mu\text{g/L}$)	$3,39 \pm 3,44$	$4,77 \pm 2,96$	0,18
Maturité ovocytaire %	$91,9 \pm 10,2$	$96,8 \pm 4,9$	0,02
Nombre d'ovocytes	$2,8 \pm 2,7$	$15,6 \pm 4,4$	<0,0001

Tableau IX : Caractéristiques des patientes classées en 2 groupes selon leur réponse ovarienne.

Comme nous l'avons vu précédemment, nous avons séparé dans notre étude de façon arbitraire les femmes en 3 groupes selon la réponse ovarienne (voir figure 17), ce qui nous a permis de retrouver une différence significative pour l'AMH sérique entre les femmes « bonnes » répondeuses d'une part et les femmes présentant une réponse ovarienne « intermédiaire » ou « insuffisante » d'autre part.

Une seule équipe à notre connaissance s'est intéressée comme nous au dosage de l'AMH en début de stimulation ovarienne. Peñarrubia *et al*, en 2005, ont étudié et comparé l'intérêt du dosage de l'AMH à J3 d'un cycle non stimulé et à J5 de la stimulation par les gonadotrophines comme marqueur prédictif de la réponse ovarienne. Pour cela, deux groupes ont été distingués : d'une part 20 femmes dont le cycle a été stoppé du fait d'une réponse ovarienne insuffisante, et d'autre part 60 femmes ayant mené à terme leur cycle de stimulation. Ils ne retrouvaient pas de différence significative entre les deux groupes pour l'âge, le BMI, la FSH et l'oestradiol à J3, la durée de stimulation et la dose de gonadotrophines consommées. Le seul marqueur présentant une différence significative était l'AMH dosée à J3 d'un cycle non stimulé ($p < 0,05$) et à J5 de la stimulation ($p < 0,001$). Cette étude montre donc l'intérêt prédictif du dosage de l'AMH au début de la stimulation ovarienne, et montre en plus sa supériorité par rapport au dosage de l'AMH à J3 d'un cycle non stimulé. Dans notre étude, 5 femmes ont vu leur cycle de stimulation stoppé, 4 pour réponse ovarienne insuffisante ou défaut de suivi de traitement, et une pour hyperstimulation ovarienne, qui a donc été exclue du groupe des arrêts de traitement pour défaut de réponse ovarienne. Le tableau X reprend les résultats que nous avons obtenus.

	Groupe arrêt de stimulation (n=4)	Groupe cycle complet (n=64)	P
âge	30,5 ± 2,6	30,2 ± 4,0	NS
FSH (UI/L)	5,75 ± 1,03	6,16 ± 1,35	NS
AMH DSL (µg/L)	0,32 ± 0,21	0,79 ± 0,63	0,14
AMH Immunotech (µg/L)	1,77 ± 1,58	4,15 ± 2,74	0,09

Tableau X : Caractéristiques des patientes selon l'arrêt ou l'achèvement du cycle de stimulation.

On ne retrouve pas de différence significative entre les deux groupes pour l'âge et la FSH à J3. Le meilleur marqueur est l'AMH, avec une différence proche du seuil de significativité ($p=0.14$ DSL[®] et $p=0.09$ Immunotech[®]). Notre étude retrouve donc sensiblement les mêmes conclusions que celle de Peñarrubia *et al* et montre l'intérêt du dosage de l'AMH en début de stimulation dans la prédiction de la réponse ovarienne. On peut s'interroger sur la pertinence de réaliser ce dosage à J5 de la stimulation plutôt qu'à J0 comme nous avons choisi de le faire. Au vu de la décroissance rapide de l'AMH sérique lors d'une stimulation ovarienne (voir figure 8) et des problèmes de sensibilité des trousse de dosage dans les valeurs basses, il semble préférable de privilégier le dosage à J0 de la stimulation, même si en pratique il sera probablement réalisé à J3 d'un cycle non stimulé.

Enfin, plusieurs équipes ont prouvé l'intérêt prédictif du compte échographique des petits follicules antraux en début de phase folliculaire. Van Rooij *et al*, en 2002, ont mesuré différents marqueurs pronostiques à J3 chez 130 femmes dans les mois précédents leur tentative de fécondation *in vitro*. L'âge, l'AMH, la FSH, l'oestradiol, l'inhibine B et le compte échographique des petits follicules antraux étaient mesurés. Les patientes étaient ensuite séparées en deux groupes en fonction de leur réponse ovarienne : les faibles répondeuses d'une part, avec 4 ovocytes ponctionnés ou moins, ainsi que les arrêts de stimulation, et les répondeuses « normales » d'autre part, avec plus de 4 ovocytes ponctionnés. L'AMH, la FSH, l'inhibine B et le compte folliculaire ont montré une différence significative entre les deux groupes. Notre étude retrouvait une différence significative pour l'AMH mais pas pour la FSH, l'inhibine B et le compte folliculaire n'étant pas testés. La meilleure corrélation entre marqueurs était obtenue pour l'AMH et le compte folliculaire ($r=0,77$). Ceci est concordant avec les résultats d'autres études (de Vet, Laven *et al*. 2002; Gruijters, Visser *et al*. 2003) qui montraient une excellente corrélation entre ces deux marqueurs. Ces études semblent donc indiquer que le compte folliculaire échographique est au moins aussi intéressant que l'AMH pour la prédiction de la réponse ovarienne. Cependant, l'AMH a l'avantage de la simplicité du prélèvement. En effet, on dose l'AMH sur le même prélèvement de sérum que le reste du bilan hormonal, que ce soit à J3 d'un cycle non stimulé ou à J0 de la stimulation comme dans notre étude. L'échographie reste un examen plus invasif, et moins confortable pour les patientes. Cependant, l'échographie donne de nombreuses informations que le bilan hormonal ne fournit pas, comme la présence éventuelle d'un kyste, de signes d'endométriose, l'épaisseur de l'endomètre, la répartition des follicules préantraux. Ainsi, même si l'AMH semble présenter quelques avantages dans la prédiction de

la réponse ovarienne, l'échographie reste un examen indispensable avant une stimulation ovarienne.

En conclusion, le dosage de l'AMH semble être le meilleur marqueur hormonal actuel de réponse ovarienne, qu'elle soit dosée à J3 d'un cycle non stimulé, à J0 ou à J5 d'un cycle de stimulation.

III – AMH ET ISSUE DE FECONDATION IN VITRO

Après avoir étudié l'intérêt prédictif du dosage de l'AMH pour la réponse ovarienne, nous nous sommes intéressés à l'issue du cycle de stimulation, à savoir l'obtention d'embryons tout d'abord, puis l'initiation d'une grossesse, et enfin l'évolutivité de celle-ci. 23 débuts de grossesse ont été obtenus dans notre population de 69 patientes (33%), ce qui représente malgré tout un faible effectif pour la réalisation de statistiques fiables et leur interprétation.

Les résultats obtenus montrent une corrélation de l'AMH avec le nombre d'embryons, équivalente pour les deux trouses, mais inférieure à celle obtenue avec le nombre d'ovocytes. La comparaison des résultats obtenus en FIV et en ICSI ne permet pas d'imputer cette moins bonne corrélation au facteur spermatique, puisqu'on retrouve le même taux de fécondation, mais un taux de grossesse supérieur en ICSI (40% versus 26%). Il n'existe pas de corrélation de l'AMH avec le taux de fécondation et la qualité embryonnaire, quelle que soit la trousse de dosage.

Concernant l'initiation d'une grossesse à la suite du transfert embryonnaire, on n'observe pas de différence significative entre l'AMH dosée en début de stimulation chez les femmes enceintes et les femmes non enceintes. Cependant, on retrouve un seuil critique pour l'AMH dosée avec la trousse Immunotech[®] à 1,40 µg/L : aucune des 23 femmes enceintes dans notre série n'a de dosage inférieur à cette valeur. **Ainsi, un dosage d'AMH supérieur à 1,40 µg/L a une valeur prédictive positive de 36% alors qu'un dosage inférieur à 1,40 µg/L a une valeur prédictive négative de 100%.** L'AMH dosée avec la trousse Immunotech[®] est donc un marqueur pronostique pour l'initiation d'une grossesse. Ce seuil critique n'existe pas avec la trousse DSL[®].

Les deux trousse DSL[®] et Immunotech[®] sont donc équivalentes sur le plan de la prédiction de la réponse ovarienne, mais seule la trousse Immunotech[®] permet de déterminer le pronostic de grossesse.

Peu d'équipes se sont penchées sur l'intérêt prédictif de l'AMH pour l'initiation d'une grossesse. Peñarrubia *et al*, en 2005, ont étudié l'intérêt du dosage de l'AMH à J5 de la stimulation, et l'ont comparé au dosage de l'AMH et de l'oestradiol à J3 d'un cycle non stimulé, ainsi qu'au dosage de l'oestradiol à J5 de la stimulation. L'exploitation des courbes ROC obtenues ne montre d'intérêt pour aucun des marqueurs dans la prédiction de l'initiation d'une grossesse. Notre étude retrouve des résultats similaires, avec des aires sous courbes proches de 0,50 pour les deux trousse (AUC DSL = 0,541, AUC Immunotech = 0,487, $p=NS$). Cependant, cette équipe ne mentionne pas la valeur prédictive négative d'un dosage d'AMH bas (valeur < 1,40 µg/L avec la trousse Immunotech[®]) comme nous l'avons montré dans notre étude. Il semble donc que la concentration de l'AMH sérique ne soit pas quantitativement corrélée à l'initiation d'une grossesse, mais l'existence d'un cut-off en dessous duquel les chances de grossesse sont réduites présente un très grand intérêt clinique. En effet, une concentration sérique d'AMH inférieure à ce seuil permet non seulement de prédire une faible réponse ovarienne, mais permet en plus d'évaluer péjorativement les chances de grossesse. Ainsi, la prise en charge de la patiente pourrait être adaptée précocement, avec par exemple une augmentation des doses de gonadotrophines ou une modification du protocole, ce qui diminuerait le risque d'échec de la stimulation.

Une autre équipe a évalué l'intérêt de l'AMH en prenant comme point de mesure final l'initiation d'une grossesse. Hazout *et al*, en 2005, montraient ainsi une bonne corrélation de l'AMH avec le nombre d'embryons obtenus *in vitro* ($r=0,34$), mais inférieure à celle obtenue avec le nombre d'ovocytes ponctionnés ($r=0,38$). Ceci est concordant avec nos résultats. Nous retrouvons en effet pour l'AMH une corrélation inférieure avec le nombre d'embryons par rapport au nombre d'ovocytes matures. Par contre, à l'inverse de cette équipe, nous ne retrouvons pas de différence significative entre l'AMH chez les femmes enceintes et les femmes non enceintes (moyenne = 0,78 µg/L versus 0,80 pour DSL[®], moyenne = 4,17 µg/L versus 4,15 pour Immunotech[®], $p=NS$). Ceci est probablement dû à la plus grande homogénéité de notre échantillon de patientes, qui sont jeunes, en première tentative pour la majorité et avec une FSH basse. Concernant la prédiction de l'obtention d'une grossesse, il est intéressant de constater que l'équipe de Hazout retrouve une valeur seuil très proche de la notre. En effet, leur étude statistique montre qu'une concentration d'AMH inférieur à 1,1

$\mu\text{g/L}$ est clairement indicatrice d'un risque d'échec, alors qu'une valeur supérieure à $1,1 \mu\text{g/L}$ est indicatrice de succès. Nous avons pour notre part montré qu'en dessous d'une concentration d'AMH de $1,40 \mu\text{g/L}$, les chances de grossesse étaient faibles, avec une excellente valeur prédictive négative de l'AMH. Notre étude, ainsi que celle de Hazout *et al*, semble donc indiquer que l'AMH sérique a une bonne valeur prédictive négative pour l'absence d'initiation d'une grossesse en fécondation *in vitro*.

En conclusion, on constate dans notre étude que l'AMH en début de stimulation est modérément corrélée au nombre d'embryons obtenus. Sa concentration n'est pas corrélée directement aux chances de grossesse. Cependant, il existe avec la trousse Immunotech[®] un seuil critique très intéressant pour sa valeur prédictive négative : une concentration d'AMH inférieure à $1,40 \mu\text{g/L}$ en début de stimulation est de mauvais pronostic pour l'initiation d'une grossesse. La trousse DSL[®] ne permet pas de déterminer ce seuil.

CONCLUSION

De nombreux couples sont confrontés au problème de l'infertilité. La prise en charge comprend notamment le bilan hormonal féminin qui doit permettre d'adapter au mieux la stimulation ovarienne. Cependant, aucun des marqueurs habituellement utilisés n'est suffisamment performant pour évaluer le statut ovarien et prédire la réponse ovarienne à la stimulation et les chances d'initier une grossesse.

Il a été récemment montré que l'Hormone Anti-Müllerienne, membre de la famille du TGF β , pourrait être liée à la réserve ovarienne, et donc à la capacité de réponse ovarienne à la stimulation, et serait supérieure aux autres marqueurs hormonaux. Le dosage de l'AMH, pour lequel il existe deux trousse commerciales de dosage, pourrait donc présenter un intérêt en médecine de la reproduction. Notre travail, mené chez 69 patientes suivies dans le service de Médecine de la Reproduction dans le cadre d'une fécondation *in vitro*, a donc consisté à déterminer les performances analytiques des deux trousse de dosage de l'AMH, ainsi que la valeur prédictive du dosage de l'AMH à J0 de la stimulation pour la réponse ovarienne et pour l'initiation ou non d'une grossesse.

Notre étude a permis de mettre en évidence un écart très important entre les résultats donnés par les deux trousse de dosage DSL[®] et Immunotech[®]. Ceci est principalement dû à l'absence de standard international pour l'AMH. Chacune des trousse présente un défaut de sensibilité dans les valeurs basses, sans que cela ne semble avoir de conséquence au niveau de l'interprétation clinique.

Concernant l'intérêt prédictif de l'AMH sérique pour la réponse ovarienne, notre étude montre que l'AMH sérique, quelle que soit la trousse de dosage, est bien corrélée à la réponse ovarienne, et présente un intérêt supérieur aux autres marqueurs hormonaux, ce qui est conforme à la littérature. La concentration d'AMH circulante est significativement plus élevée chez les femmes présentant une bonne réponse ovarienne. L'AMH sérique est moins bien corrélée au nombre et à la qualité des embryons obtenus. Ceci peut s'expliquer par l'introduction d'un biais important lié à l'intervention de la qualité spermatique.

Même si elle n'est pas directement corrélée aux chances d'initier une grossesse au terme du cycle de FIV, l'AMH sérique dosée avec la trousse Immunotech[®] présente un grand intérêt du fait de l'existence d'un seuil prédictif. Ainsi, une AMH sérique inférieure à 1,40 $\mu\text{g/L}$ a une valeur prédictive négative de 100% pour l'initiation d'une grossesse. Dans notre étude, la trousse DSL[®] n'a pas permis de déterminer ce seuil.

Ainsi, l'AMH sérique semble donc un marqueur très prometteur en biologie de la reproduction. Des études sur de plus grandes séries permettront de préciser et valider les seuils décisionnels. Cependant, l'AMH reste un des éléments du bilan initial, et ne remplace

pas pour l'instant ni les autres marqueurs hormonaux habituels (FSH, E2), ni l'échographie. D'autre part, on peut s'interroger sur la pertinence d'un critère biologique très tranché en terme de chance de grossesse. En effet, les critères cliniques, psychologiques doivent évidemment être pris en compte, et il semble difficilement acceptable de refuser la prise en charge en procréation médicale assistée au vu d'un seul résultat biologique, au risque d'exclure des patientes qui auraient pu démarrer une grossesse. La place de l'AMH au sein du bilan en biologie de la reproduction reste donc à définir.

ANNEXE

Principales caractéristiques des 69 patientes suivies dans notre étude.

Patiente	AGE	FSH	E2	nombre ovocytes ponctionnés	nombre ovocytes injectés / inséminés	embryons obtenus	initiation d'une grossesse	AMH DSL (µg/L)	AMH Immunotech (µg/L)
1	29	5,5	<20	28	12	7	non	1,92	9,71
2	25	6,4	ND	15	11	8	non	0,44	4,27
3	33	6,7	36	2	2	1	non	0,62	4,73
4	33	6,3	44	10	6	3	oui	0,54	4,26
5	25	6,1	52	15	7	3	non	0,67	3,63
6	25	ND	ND	15	8	6	non	0,48	4,73
7	28	5,8	19	0			non	0,02	0,34
8	27	5,7	47	0			non	2,64	12,97
9	22	6,7	<20	14	12	10	non	0,52	1,93
10	34	6,4	22	16	14	0	non	0,23	1,59
11	27	8,4	47	9	5	2	non	1,78	9,87
12	31	7,5	23	9	7	4	oui	0,74	3,68
13	28	5,5	<20	19	17	9	non	0,7	4,86
14	33	6,7	49	10	7	6	oui	0,42	2,23
15	28	5,1	44	11	5	3	oui	0,46	1,78
16	31	5,8	35	12	12	0	non	0,75	3,82
17	29	5,2	39	11	7	4	oui	3,49	15,22
18	30	7,9	43	15	9	5	non	0,45	3,15
19	35	4,6	87	10	7	2	non	0,7	2,48
20	34	4,4	43	0			non	0,33	0,59
21	27	7,7	24	13	7	0	non	0,51	2,56
22	25	6,6	23	26	8	6	oui	0,95	4,37
23	32	8,4	28	6	4	1	oui	0,46	2,73
24	35	5,6	42	7	4	3	non	0,41	1,29
25	32	9,2	23	14	12	12	oui	0,86	4,6
26	25	6,2	23	21	10	6	non	0,74	4,35
27	29	5,7	39	15	7	5	non	0,68	3,34
28	26	5,7	57	4	4	4	non	0,34	0,82
29	33	5	46	8	8	7	oui	0,32	1,6
30	27	7,3	100	19	12	7	non	1,27	5
31	28	3,3	35	15	8	8	non	0,46	2,55
32	32	4,6	20	13	3	2	non	0,74	2,25
33	31	7,1	47	10	9	4	non	1,64	6,29
34	29	9	56	7	6	5	oui	0,21	1,43
35	38	8,2	43	6	5	5	non	0,16	1,89
36	34	6,15	33	16	16	9	non	0,46	3,07
37	32	5,9	45	8	6	4	oui	0,59	3,62
38	24	6,2	37	5	4	3	non	0,74	3,56
39	28	3,8	58	14	8	5	oui	0,26	2,59
40	36	6,5	44	10	3	2	non	0,45	1,52

41	27	ND	ND	20	18	12	oui	0,26	2,67
42	39	5	28	28	24	13	oui	2,18	7,89
43	24	6,6	46	7	7	5	oui	0,7	3,26
44	34	6,7	26	12	10	4	oui	0,11	2,41
45	37	4,1	<20	14	13	3	non	0,51	7,39
46	30	4,4	30	6	2	2	oui	0,9	5,58
47	32	4,5	38	17	17	10	oui	1,23	8
48	31	7,1	35	15	15	6	non	2,83	8
49	36	5,7	17	7	6	5	non	0,49	2,39
50	29	5,2	39	17	13	6	non	1,19	6,7
51	35	7,2	54	12	1	0	non	0,18	1,48
52	29	5,9	56	9	6	4	oui	0,69	3
53	30	5,3	54	10	7	3	non	0,55	2,69
54	30	7,6	69,7	14	11	8	oui	1,44	8,59
55	33	7,3	54	15	13	11	oui	0,65	3,21
56	31	5,9	49	15	15	13	non	0,92	4,52
57	32	5,15	28	11	8	7	non	0,88	3,21
58	34	4,7	45	13	13	11	non	0,64	4,13
59	28	6,5	19	7	4	3	non	0,59	2,85
60	29	3,8	38	11	11	10	non	1,8	11,84
61	23	7	36	15	11	5	non	0,85	4,44
62	31	5,9	ND	0			non	0,52	3,73
63	27	6,9	36	22	10	2	non	0,92	4,36
64	30	5,8	<25	11	6	5	oui	0,27	1,55
65	30	6,7	40	5	2	0	non	0,32	1,34
66	29	6,9	46	0			non	0,41	2,36
67	29	8,6	28	13	11	7	non	0,45	4,06
68	40	3	59	8	4	1	oui	0,12	1,69
69	25	6,4	25	11	11	3	non	1,62	7,19

Tableau XI : Principales caractéristiques des 69 patientes suivies dans notre étude

LEXIQUE

AMH : Hormone Anti-Müllerienne

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

AMHR1 / AMHR2 : Récepteur de l'AMH type 1 / 2

BMI : Body Mass Index

CV : Coefficient de Variation

DNC : Délai Nécessaire à Concevoir

E2 : 17 β oestradiol

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FIV : Fécondation *in vitro*

FSH : Follicule-Stimulating Hormone , Hormone Folliculostimulante

GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone

hCG : human Chorionic Gonadotropin, Gonadotrophine Chorionique humaine

ICSI : Intracytoplasmic Sperm Injection

IMC : Index de Masse Corporelle

LH : Luteinizing Hormone, hormone luteïnisante

NF- κ B : Nuclear Factor κ B

PMDS : Syndrome de Persistance des Canaux de Müller

TGF β : Transforming Growth Factor β

UI : Unités Internationales

BIBLIOGRAPHIE

- Bath, L. E., W. H. Wallace, *et al.* (2003). "Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Mullerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound." Hum Reprod **18**(11): 2368-74.
- Belville, C., H. Van Vlijmen, *et al.* (2004). "Mutations of the anti-mullerian hormone gene in patients with persistent mullerian duct syndrome: biosynthesis, secretion, and processing of the abnormal proteins and analysis using a three-dimensional model." Mol Endocrinol **18**(3): 708-21.
- Cook, C. L., Y. Siow, *et al.* (2000). "Serum mullerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles." Fertil Steril **73**(4): 859-61.
- de Vet, A., J. S. Laven, *et al.* (2002). "Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging." Fertil Steril **77**(2): 357-62.
- Deffieux, X. and J. M. Antoine (2003). "[Inhibins, activins and anti-Mullerian hormone: structure, signalling pathways, roles and predictive value in reproductive medicine]." Gynecol Obstet Fertil **31**(11): 900-11.
- di Clemente, N., N. Josso, *et al.* (2003). "Components of the anti-Mullerian hormone signaling pathway in gonads." Mol Cell Endocrinol **211**(1-2): 9-14.
- Durlinger, A. L., M. J. Gruijters, *et al.* (2001). "Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary." Endocrinology **142**(11): 4891-9.
- Durlinger, A. L., P. Kramer, *et al.* (1999). "Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary." Endocrinology **140**(12): 5789-96.
- Durlinger, A. L., J. A. Visser, *et al.* (2002). "Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone." Reproduction **124**(5): 601-9.
- Fanchin, R., L. M. Schonauer, *et al.* (2003). "Serum anti-Mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation." Hum Reprod **18**(2): 328-32.
- Fanchin, R., L. M. Schonauer, *et al.* (2003). "Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3." Hum Reprod **18**(2): 323-7.
- Fujisawa, M., T. Yamasaki, *et al.* (2002). "The significance of anti-Mullerian hormone concentration in seminal plasma for spermatogenesis." Hum Reprod **17**(4): 968-70.

- Gruijters, M. J., J. A. Visser, *et al.* (2003). "Anti-Mullerian hormone and its role in ovarian function." Mol Cell Endocrinol **211**(1-2): 85-90.
- Hamamah, S. (2001). Médecine et biologie de la reproduction.
- Hazout, A., P. Bouchard, *et al.* (2004). "Serum antimullerian hormone/mullerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol." Fertil Steril **82**(5): 1323-9.
- Josso, N., C. Belville, *et al.* (2005). "AMH and AMH receptor defects in persistent Mullerian duct syndrome." Hum Reprod Update **11**(4): 351-6.
- Josso, N. and N. Clemente (2003). "Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family." Trends Endocrinol Metab **14**(2): 91-7.
- Josso, N., N. di Clemente, *et al.* (2001). "Anti-Mullerian hormone and its receptors." Mol Cell Endocrinol **179**(1-2): 25-32.
- La Marca, A., V. De Leo, *et al.* (2005). "Anti-Mullerian Hormone in Premenopausal Women and After Spontaneous or Surgically Induced Menopause." J Soc Gynecol Investig.
- Lasala, C., D. Carre-Eusebe, *et al.* (2004). "Subcellular and molecular mechanisms regulating anti-Mullerian hormone gene expression in mammalian and nonmammalian species." DNA Cell Biol **23**(9): 572-85.
- Lee, M. M., M. Misra, *et al.* (2003). "MIS/AMH in the assessment of cryptorchidism and intersex conditions." Mol Cell Endocrinol **211**(1-2): 91-8.
- Long, W., W. Wang, *et al.* (2000). "[Study on the anti-mullerian hormone served as a marker for granulosa cell tumor of ovary]." Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi **35**(6): 356-8.
- Long, W. Q., V. Ranchin, *et al.* (2000). "Detection of minimal levels of serum anti-Mullerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay." J Clin Endocrinol Metab **85**(2): 540-4.
- Lutchman Singh, K., M. Davies, *et al.* (2005). "Fertility in female cancer survivors: pathophysiology, preservation and the role of ovarian reserve testing." Hum Reprod Update **11**(1): 69-89.
- Muttukrishna, S., H. Suharjono, *et al.* (2004). "Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients?" Bjog **111**(11): 1248-53.
- Olivennes F., F. R., Hazout A. (2002). Assistance médicale a la procréation.
- Picard, J. Y. and C. Belville (2002). "[Genetics and molecular pathology of anti-Mullerian hormone and its receptor]." J Soc Biol **196**(3): 217-21.

- Pouly, J. L., A. Bachelot, *et al.* (2004). "[Comparison of agonists versus antagonists for i.v.f. stimulation: the French FIVNAT survey 2001-2002]." Gynecol Obstet Fertil **32**(9): 737-40.
- Rey, R. (2000). "Assessment of seminiferous tubule function (anti-mullerian hormone)." Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **14**(3): 399-408.
- Rey, R., C. Lukas-Croisier, *et al.* (2003). "AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation." Mol Cell Endocrinol **211**(1-2): 21-31.
- Rey, R. and J. Y. Picard (1998). "Embryology and endocrinology of genital development." Baillieres Clin Endocrinol Metab **12**(1): 17-33.
- Rey, R., J. C. Sabourin, *et al.* (2000). "Anti-Mullerian hormone is a specific marker of sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors." Hum Pathol **31**(10): 1202-8.
- Salhi, I., S. Cambon-Roques, *et al.* (2004). "The anti-Mullerian hormone type II receptor: insights into the binding domains recognized by a monoclonal antibody and the natural ligand." Biochem J **379**(Pt 3): 785-93.
- Seifer, D. B., D. T. MacLaughlin, *et al.* (2002). "Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles." Fertil Steril **77**(3): 468-71.
- Taieb, J., C. Benattar, *et al.* (2003). "[Hormone determination in the management and monitoring of cycles of medically-assisted reproductive technology: value and difficulties of use]." Ann Biol Clin (Paris) **61**(5): 533-40.
- Teixeira, J., E. Fynn-Thompson, *et al.* (1999). "Mullerian-inhibiting substance regulates androgen synthesis at the transcriptional level." Endocrinology **140**(10): 4732-8.
- Teixeira, J., S. Maheswaran, *et al.* (2001). "Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications." Endocr Rev **22**(5): 657-74.
- Themmen, A. P. (2005). "Anti-Mullerian hormone: its role in follicular growth initiation and survival and as an ovarian reserve marker." J Natl Cancer Inst Monogr(34): 18-21.
- van Rooij, I. A., F. J. Broekmans, *et al.* (2005). "Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study." Fertil Steril **83**(4): 979-87.
- van Rooij, I. A., F. J. Broekmans, *et al.* (2002). "Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve." Hum Reprod **17**(12): 3065-71.
- Visser, J. A. (2003). "AMH signaling: from receptor to target gene." Mol Cell Endocrinol **211**(1-2): 65-73.

Visser, J. A. and A. P. Themmen (2005). "Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis." Mol Cell Endocrinol **234**(1-2): 81-6.

Xavier, F. and S. Allard (2003). "Anti-Mullerian hormone, beta-catenin and Mullerian duct regression." Mol Cell Endocrinol **211**(1-2): 115-21.

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

Année de la soutenance
2005

Noms – Prénoms : FREOUR, Thomas, Etienne

Titre de la thèse : L'Hormone anti-Müllérienne : comparaison de deux trousse de dosage et intérêt de son évaluation chez la femme en médecine de la reproduction.

Résumé de la thèse : L' Hormone anti-Müllérienne est récemment apparue comme un marqueur prometteur au sein du bilan hormonal dans la prise en charge d'un couple en médecine de la reproduction. Les résultats fournis par les deux kits de dosage existant (DSL[®] et Immunotech[®]) montrent un écart important, ce qui peut s'expliquer par l'absence de standard international. Notre étude prospective menée chez 69 femmes suivies pour FIV confirme l'intérêt de l'AMH dans la prédiction de la réponse ovarienne et sa supériorité sur la FSH et l'oestradiol. Seule la trousse Immunotech[®] permet de déterminer un seuil prédictif pour l'initiation d'une grossesse, situé à 1,40 µg/L.

MOTS-CLES : -Hormone anti-Müllérienne - Réponse ovarienne -Fertilité

JURY

Président : Mr Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie, UFR de Pharmacie de Nantes

Assesseurs : Mr Paul BARRIERE, Professeur de Médecine de la Reproduction, Service de Médecine de la reproduction, CHU de Nantes

Mme Sophie MIRALLIE, PH, Service de Médecine de la reproduction, CHU de Nantes

Mr Damien Masson, MCU-PH Biochimie spécialisée, CHU de Nantes

Adresse de l'auteur : Thomas FREOUR

18 rue Auguste Brizeux - 44000 NANTES