



HAL
open science

L'hormone anti-müllérienne : rôle, intérêt et comparaisons de techniques de dosages en PMA

Andreea Maftei Ion

► **To cite this version:**

Andreea Maftei Ion. L'hormone anti-müllérienne : rôle, intérêt et comparaisons de techniques de dosages en PMA. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02974459

HAL Id: dumas-02974459

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02974459>

Submitted on 21 Oct 2020

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

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

Université de Bordeaux
U.F.R DES SCIENCES MEDICALES

Année 2020

N° 3087

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement le 22 Septembre 2020

par

Andreea MAFTEI ION

Née le 22 janvier 1990 à Galați

**L'HORMONE ANTI-MÜLLERIENNE:
Rôle, intérêt
et comparaisons de techniques de dosages en PMA**

Directeur de thèse : Madame le Docteur Agnès GEORGES

Membres du jury

Madame le Professeur Laurence BORDENAVE	Président
Monsieur le Professeur Jean-Benoît CORCUFF	Membre
Madame le Docteur Marie-Lise BATS	Rapporteur
Madame le Docteur Cindy LAURO	Membre

Université de Bordeaux

U.F.R DES SCIENCES MEDICALES

Année 2020

N° 3087

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement le 22 Septembre 2020

par

Andreea MAFTEI ION

Née le 22 janvier 1990 à Galați

L'HORMONE ANTI-MÜLLERIENNE:

Rôle, intérêt

et comparaisons de techniques de dosages en PMA

Directeur de thèse : Madame le Docteur Agnès GEORGES

Membres du jury

Madame le Professeur Laurence BORDENAVE	Président
Monsieur le Professeur Jean-Benoît CORCUFF	Membre
Madame le Docteur Marie-Lise BATS	Rapporteur
Madame le Docteur Cindy LAURO	Membre

REMERCIEMENTS

A mon directeur de thèse, Madame le Docteur Agnès Georges-Walryck

Praticien hospitalier

Laboratoire de Médecine nucléaire, CHU de Bordeaux

Je vous remercie pour votre intérêt et votre soutien au cours de mes deux stages d'hormonologie. Je vous remercie également pour vos conseils durant la rédaction de ma thèse. Mes remerciements les plus sincères.

A mon Président du Jury, Madame le Professeur Laurence Bordenave

Professeur des Universités, Praticien hospitalier

Service de Médecine nucléaire, CHU de Bordeaux

Vous me faites un grand honneur en acceptant de présider ce Jury. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance. Je vous adresse mes remerciements les plus sincères.

A mon Rapporteur, Madame le Docteur Marie-Lise Bats

Maître de Conférence des Universités, Praticien hospitalier

Laboratoire de Biochimie, CHU de Bordeaux

Je vous remercie d'avoir accepté d'être le rapporteur de mon travail.

Vous êtes la première à m'avoir accueillie au sein du laboratoire du CHU et je vous remercie pour vos encouragements et votre gentillesse lors du début de mon internat.

Je vous remercie également d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenue tout au long de mes stages. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

Aux membres du Jury,

Monsieur le Professeur Jean-Benoît Corcuff

Maître de Conférence des Universités, Praticien hospitalier

Service de Médecine nucléaire, CHU de Bordeaux

Je vous remercie de me faire l'honneur de participer au Jury de ma soutenance.

Je vous remercie pour votre gentillesse, pour votre disponibilité et pour votre bonne humeur pendant mes deux stages d'hormonologie. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Madame le Docteur Cindy Lauro

Praticien hospitalier

Service de Médecine nucléaire, CHU de Bordeaux

Je te remercie de m'avoir accompagnée avec gentillesse pendant mes deux stages d'hormonologie, de m'avoir très bien appris les choses et d'avoir répondu avec patience à toutes mes questions. Je te remercie surtout d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements les plus sincères.

Je tiens à remercier également:

A toutes les volontaires de ce travail qui ont "donné du sang pour la science". Un grand merci !! Sans vous cet étude n'aurait pas été possible.

Aux fournisseurs Biomérieux et Fujirébio pour tous les matériels techniques et les informations mis à notre disposition.

Au Laboratoire Exalab de Haillan, merci de m'avoir permis de réaliser les dosages d'AMH au sein de votre laboratoire.

Julie Brossaud, merci pour votre gentillesse et merci d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes interrogations.

Les techniciens du PTRR et de Médecine Nucléaire de Haut-Lévêque, pour votre compagnie pendant mes deux stages d'Hormonologie. Merci pour les interminables dilutions de cortisol et d'aldostérone quand les fameux KT's de vendredi arrivaient et pour votre aide à la recherche des tubes...

A Quitterie, pour sa gentillesse, merci d'avoir volontairement réalisé ces dosages sur Vidas..

A Jojo, un coup de cœur; merci pour les beaux après-midis passés ensemble.

Aux co-internes,

Charvind, pour sa gentillesse et pour son aide précieux lors du recrutement des volontaires participantes à mon étude.

Rhanou, pour ses coups de boost.

Paul et Julien, pour leur charme et pour la bonne ambiance sur le PABiM.

A mes amis,

A Imene, pour son soutien pendant les stages d'internat et pour les beaux moments passés ensemble. Un grand merci ! sans toi ces années n'auraient pas été pareil.

A Tania, pour ces années d'internat que l'on a surmonté ensemble et pour ses encouragements pendant le travail de cet étude.

A Diana, pour sa gentillesse et pour les informations précieuses à la réalisation de ce travail.

A Anne-Sophie et à Maxime, pour leur exemple de gentillesse.

A Dan, mon médecin ophtalmo, pour son charme et ses originaux coups de boost "la petite interne", "ne te presse pas, t'as le temps"...merci, ça a mis du temps mais ça a marché !

A ma famille,

A toute ma famille ! Et en particulier :

A mes grands-parents, pour les belles vacances passées à la campagne, pour votre soin et votre gentillesse. Et ne t'inquiètes pas papi, on a de quoi manger, faut pas nous envoyer de l'argent !

A mes parents, pour leur gentillesse, leurs conseils précieux et leur soutien tout au long de ma vie. Merci pour tout ! Je vous aime de tout mon cœur !

A Valentin, pour ta tendresse, ta patience, ta joie de vivre et ta bonne humeur, ton amour, ton soutien et pour ces belles années passées ensemble, quand on a appris des précieuses leçons de vie. Tu sais déjà très bien que je t'aime et que tu fais de moi une femme très heureuse.

A tous mes enseignants de CHU de Bordeaux, pour votre amabilité, votre patience et votre soutien tout au long de mon internat. Je suis reconnaissante d'avoir eu la possibilité de travailler avec vous et d'être formée par vous. Vous m'avez permis d'aller jusqu'au bout, ce travail en est la preuve.

Mes remerciements les plus sincères.

“Nous savons en outre que Dieu fait concourir toutes choses au bien de ceux qui l'aiment.”

(Romains 8 ; 28)

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	2
SOMMAIRE.....	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	9
ABREVIATIONS.....	11
INTRODUCTION.....	12
PARTIE I : AMH – PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE.....	14
I. Généralités sur l’hormone anti-mullérienne	14
I.1 Historique	14
I.2 Structure	15
I.3 Synthèse	16
I.4 Embryogenèse	17
I.5 Mécanisme d’action de l’AMH	17
I.6 Rôle de l’AMH	18
I.6.1 Rôle de l’AMH dans la différenciation sexuelle.....	18
I.6.2 Rôle de l’AMH chez l’homme	18
I.6.2.1 Régulation du taux d’AMH chez l’homme	19
I.6.2.2 Concentration sériques de l’AMH et fertilité chez l’homme.....	20
I.6.3 Rôle de l’AMH chez la femme.....	20
I.6.3.1 Physiologie ovarienne.....	20
I.6.3.2 Rôle de l’AMH dans la physiologie ovarienne	23
I.7 Variations des concentrations d’AMH	26
I.7.1 AMH en fonction de l’âge.....	26
I.7.2 AMH et facteurs environnementaux	27
I.7.3 AMH au cours du cycle menstruel.....	28
II. Dosages de l’AMH.....	29
II.1 Méthodes de dosage	29
II.1.1 Milieux biologiques	29
II.1.2 Les techniques de dosage.....	29
II.1.2.1 Première génération.....	29
II.1.2.2 Deuxième génération.....	30

II.1.2.3	Troisième génération	30
II.2	Valeurs de référence	30
III.	Intérêts cliniques de l'AMH	31
III.1	Intérêt chez la femme	31
III.1.1	AMH et grossesse	31
III.1.1.1	Réserve ovarienne et réponse à la stimulation	31
III.1.1.2	AMH et résultats du traitement par citrate de clomifène – corrélation	35
III.1.1.3	AMH ou FSH comme facteurs prédictifs de la naissance	36
III.1.1.4	AMH et qualité embryonnaire	37
III.2	AMH et Syndrome des ovaires polykystiques	39
III.2.1	AMH comme facteur prédicteur d'une naissance prématurée dans un contexte de SOPK	41
III.2.2	Les valeurs de l'AMH pendant la grossesse : SOPK et patientes contrôle	43
III.3	En pédiatrie: AMH et désordres du développement sexuel (DSD).....	45
IV.	AMH et cancer	46
IV.1	Préservation de la fertilité féminine.....	46
IV.2	Traitement du cancer chez l'enfant : effets à long terme sur les marqueurs de la réserve ovarienne	49
PARTIE II:NOTRE ETUDE.....		50
I.	But de l'étude	51
II.	Matériel et Méthodes.....	52
II.1	Echantillons.....	52
II.2	Stabilité des prélèvements	53
II.3	Automates.....	53
II.3.1	Cobas e 601®.....	53
II.3.1.1	Caractéristiques.....	53
II.3.1.2	Kit Elecsys® AMH.....	54
II.3.1.3	Echantillon.....	54
II.3.1.4	Principe du test.....	55
II.3.1.5	Performances analytiques	55

II.3.2	Lumipulse G600II®	56
II.3.2.1	Caractéristiques.....	56
II.3.2.2	Kit d'AMH Lumipulse® G	57
II.3.2.3	Echantillon.....	58
II.3.2.4	Principe de la procédure.....	58
II.3.2.5	Performances analytiques	59
II.3.3	Vidas®	60
II.3.3.1	Caractéristiques.....	60
II.3.3.2	Kit Vidas® AMH.....	62
II.3.3.3	Principe de la procédure.....	62
II.3.3.4	Echantillon.....	62
II.3.3.5	Performances analytiques	62
III.	Résultats.....	64
III.1	Comparaison de méthodes	67
III.1.1	Cobas® versus Vidas®	67
III.1.1.1	Courbe de régression linéaire	67
III.1.1.2	Diagramme de Bland-Altman	68
III.1.2	Cobas® versus Lumipulse®.....	70
III.1.2.1	Courbe de régression linéaire	70
III.1.2.2	Diagramme de Bland-Altman	71
III.2	Valeurs de référence	72
III.2.1	Valeurs de référence Roche.....	73
III.2.2	Valeurs de référence Fujirébio	74
III.2.3	Valeurs de référence Biomérieux	75
IV.	Discussions	76
IV.1	Interprétation des résultats en vue diagnostique	76
IV.2	D'autres études comparatives sur Lumipulse® et Vidas®	77
IV.2.1	Etudes comparatives sur Lumipulse®	77
IV.2.2	Etudes comparatives sur Vidas®.....	78
IV.3	Regard personnel sur les automates testés.....	80

IV.4 Inscription de l'AMH à la NABM.....	81
CONCLUSION.....	82
BIBLIOGRAPHIE.....	84
SERMENT D'HIPPOCRATE	91
RESUME.....	92

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1. Représentation schématique de la structure d'AMH et de son mécanisme d'action au niveau cellulaire.....	16
Figure 2. Variation du taux de testostérone intratesticulaire et de l'AMH plasmatique au cours de la vie.....	18
Figure 3. Structure de l'ovaire et croissance folliculaire	21
Figure 4. La folliculogénèse.....	22
Figure 5. Action régulatrice de l'AMH sur l'ovaire	24
Figure 6. Proportions de follicules viables aux niveaux primordial, primaire et stades secondaires de développement.....	25
Figure 7. Vue histologique typique du tissu ovarien	25
Figure 8. Variation physiologique de l'AMH en fonction de l'âge.....	26
Figure 9. Effet de la FSH sur la croissance des follicules et sur la sécrétion d'AMH dans l'ovaire, avec ou sans utilisation de la pilule contraceptive.....	27
Figure 10. AMH et compte de follicules antraux.....	32
Figure 11. Prise en charge personnalisée de la stimulation ovarienne	34
Figure 12. : Sécrétion d'AMH durant la folliculogénèse.....	35
Figure 13. Diagnostic de l'insuffisance ovarienne par niveaux d'AMH, en pré-cycle FIV.....	38
Figure 14. Diagnostic de la réponse ovarienne faible après le cycle FIV , par le rendement en ovocytes.....	38
Figure 15. Mécanisme d'action de l'AMH sur les neurones à GnRH.....	41
Figure 16. Détermination longitudinale des taux d'AMH chez les femmes atteintes du SOPK avant la grossesse et à chaque trimestre	44
Figure 17. Détermination longitudinale des taux d'AMH chez les témoins avant la grossesse et à chaque trimestre	44
Figure 18. Cobas e 601®, Roche	54
Figure 19. Principe du dosage d'AMH sur Cobas®.....	55
Figure 20. Lumipulse G 600II ®, Fujirébio	57
Figure 21. AMH – principe du dosage, Lumipulse ®.....	58
Figure 22. Principe du test unique Vidas®.....	61
Figure 23. Vidas®, Biomérieux.....	61
Figure 24. Résultats d'AMH par patient et par technique	66
Figure 25. Droite de régression linéaire des résultats Cobas® vs Vidas®	67

Figure 26. Diagramme de Bland-Altman, résultats d'AMH Cobas® et Vidas®.....	68
Figure 27. Droite de régression linéaire des résultats Cobas® vs Lumipulse®.....	70
Figure 28. Diagramme de Bland-Altman, résultats d'AMH Cobas® et Lumipulse®.....	71
Figure 29. Droite de régression linéaire des résultats d'AMH - Vidas® vs X®	79

Tableaux

Tableau 1. Valeurs de signification statistique et AUC de l'AMH et du CFA.....	36
Tableau 2. Répartition d'AMH sur une cohorte de grossesses	42
Tableau 3. Répartition des niveaux d'AMH chez les femmes avec et sans SOPK en fonction du moment de l'accouchement.....	43
Tableau 4. Exactitude diagnostique des mesures prédictives pour la reprise de la menstruation (n = 60).....	48
Tableau 5. AMH sur Cobas®. Aperçu des performances analytiques.....	56
Tableau 6. AMH sur Lumipulse G600II®. Aperçu des performances analytiques	59
Tableau 7. Spécificité d'AMH cf une étude sur Lumipulse G600II®	60
Tableau 8. AMH sur Vidas®. Aperçu des performances analytiques.....	63
Tableau 9. Spécificité d'AMH d'après une étude sur Vidas®.....	63
Tableau 10. Résultats d'AMH obtenus sur chaque automate	64
Tableau 11. Différence des résultats d'AMH sur les automates Cobas® et Vidas®.....	69
Tableau 12. Différence des résultats d'AMH sur les automates Cobas® et Lumipulse®.....	72
Tableau 13. Valeurs de référence Roche	73
Tableau 14. Valeurs de référence Fujirébio	74
Tableau 15. Valeurs de référence Biomérieux.....	75
Tableau 16. Différences de diagnostic en fonction de la technique utilisée.....	76
Tableau 17. Comparaison méthodes Lumipulse G1200® - Roche Elecsys®.....	78
Tableau 18. Comparaison méthodes Lumipulse G1200® - Roche Elecsys®.....	78
Tableau 19. Aperçu des automates utilisés dans l'étude	80

ABREVIATIONS

AMH : hormone antimüllérienne

AMH-KO : population chez laquelle le gène d'AMH est invalidé

AMH-RI : récepteur spécifique de l'AMH de type I

AMH-RII : récepteur spécifique de l'AMH de type II

AMP : assistance médicale à la procréation

AMPPD : sel disodique de 3-(2'-spiroadamantane)-4-méthoxy-4-(3''phosphoryloxy) phényl-1, 2-dioxétane

CFA : compte de follicules antraux

CLEIA : automate d'immuno-analyse par chimioluminescence

DSD : *disorder of sexual differentiation* - troubles de la différenciation sexuelle

E2 : œstradiol

ECL : électrochimiluminescence

ELFA : Enzyme Linked Fluorescent Assay

FIV : fécondation in vitro

FSH : hormone folliculo-stimulante

GnRH : hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires

HAS : Haute Autorité de Santé

IA : insémination artificielle

IOP : insuffisance ovarienne prématurée

IQR : intervalle interquartile

LH : hormone lutéinisante

Li : Lithium

NABM : nomenclature des actes de biologie médicale

PMA : *procréation médicalement assistée*

PMDS : syndrome de persistance des canaux müllériens

ROC : courbe ROC - *receiver operating characteristic*

SCI : survivant d'un cancer infantile

SHSO : syndrome d'hyperstimulation ovarienne

SOC : stimulation ovarienne contrôlée

SOPK : syndrome des ovaires polykystiques

TGF : Transforming Growth Factor

INTRODUCTION

Johannes Peter Müller (1801 – 1858), physiologiste et anatomiste allemand est connu pour avoir fait la première description des canaux de Müller en 1830, dans son texte « Bildungsgeschichte der Genitalien ». Les canaux de Müller constituent avec les canaux de Wolff, les voies génitales doubles de l'embryon lors du stade indifférencié du développement de l'appareil génital des mammifères. Un demi-siècle plus tard, Lillie F. a rapporté le veau freemartin, le produit de jumeaux hétérosexuels avec un placenta partagé. Ce phénomène, qui a également été reconnu comme un exemple précoce de chimérisme immunologique, est devenu tout aussi important pour la compréhension de la biologie de la reproduction, car la femelle de la paire de jumeaux a présenté une régression des canaux de Müller et a été masculinisée à l'extérieur (1). Ceci est dû aux hormones masculinisantes produites par les testicules et véhiculées par voie sanguine jusqu'à l'embryon femelle. On observe alors une régression mullérienne et une persistance wolffienne.

Plus tard, Alfred Jost a effectué des expériences embryonnaires séminales in vivo qui ont démontré l'existence de ce qu'il a appelé l'hormone antimüllérienne (2) . L'hormone antimüllérienne (AMH), protéine sécrétée par les cellules de la granulosa, constitue un marqueur quantitatif de la réserve ovarienne. Le dosage de l'hormone antimüllérienne tient une place de première importance dans le cadre du bilan de fertilité. Elle permet de vérifier la réponse à la stimulation ovarienne lors d'une fécondation in vitro (FIV) ou d'une insémination artificielle (IA) et de détecter les risques de syndrome d'hyperstimulation ovarienne (SHO). Elle peut aussi être utilisée pour prédire l'âge de la ménopause et aider au diagnostic du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK).

Initialement étudiée pour son rôle dans la différenciation testiculaire, l'AMH fut mesurée pour la première fois en 1990 (3). Depuis, les techniques ont beaucoup évolué et trois générations de dosages se sont suivies. La première et deuxième génération sont des dosages manuels. L'automatisation est apparue lors de la troisième génération.

Différents tests de dosage d'AMH existent, proposés par différentes techniques, mais actuellement nous n'en disposons pas dans notre laboratoire. A présent, au sein du CHU de Bordeaux, l'AMH est une analyse très prescrite par les médecins, surtout dans le service de procréation médicalement assistée (PMA).

A la faveur de l'arrivée de l'automate Fujirébio, nous avons voulu observer les différences de résultats fournis par différentes techniques. Ainsi il m'a été confié le recrutement et la réalisation de dosages sur 3 systèmes analytiques différents.

Dans une première partie , nous nous efforcerons de faire une revue de la littérature sur le rôle et l'intérêt de l'AMH en clinique. Dans une deuxième partie, nous décrirons l'étude réalisée dans le laboratoire d'hormonologie au CHU de Bordeaux et la comparaison entre les résultats obtenus pour les dosages d'AMH, obtenues par trois techniques différentes : Roche, Biomérieux et Fujirébio.

PARTIE I:

AMH - physiologie et physiopathologie

La reproduction des mammifères est contrôlée au niveau du cerveau par une petite population de neurones spécifiques de l'hypothalamus qui sécrètent de la GnRH (*gonadotropin releasing hormone*, hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires, aussi appelée LHRH, luteinizing hormone releasing hormone). La GnRH est libérée dans les capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire puis véhiculée dans l'hypophyse antérieure où elle commande la sécrétion des gonadotrophines (4), l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH), qui à leur tour, vont réguler l'activité gonadique (5). Elles sont constituées de deux sous-unités, une sous-unité α qui leur est commune et une sous-unité β qui est spécifique de chaque hormone et qui sont codées par des gènes distincts (6).

Chez les mammifères femelles, une partie de l'activité ovarienne est indépendante des gonadotrophines, à savoir la croissance folliculaire depuis son début jusqu'au stade de petit follicule antral. De nombreux facteurs interviennent dans ce phénomène, en particulier l'hormone anti-müllérienne (7).

L'hormone anti-müllérienne est une glycoprotéine d'origine gonadique de la famille du *Transforming Growth Factor* (TGF)- β . Elle est responsable, chez le fœtus male, de la régression des canaux de Müller qui constituent l'ébauche de l'utérus, des trompes et de la partie supérieure du vagin, d'où l'origine de son nom.

I.Généralités sur l'hormone anti-mullérienne

I.1 Historique

L'AMH a été découverte par le français Alfred Jost au décours de trois expériences princeps réalisées entre 1947 et 1952. La première expérience a consisté à pratiquer une castration chez des embryons de lapins, alors que leurs gonades étaient au stade indifférencié. Un développement de l'appareil génital dans le sens féminin a été observé chez tous les lapins castrés quel que soit le sexe génétique. Suite à cette expérience, il

conclut que les testicules sont indispensables au développement du phénotype mâle. Dans un deuxième temps, il a greffé un testicule fœtal chez un fœtus femelle de lapine et a observé un développement de type mâle, avec une régression des canaux de Müller, au huitième jour. Cette expérience prouve que le testicule sécrète des substances « masculinisantes ». Cependant, lors de l'implantation d'un cristal de testostérone à proximité d'un ovaire de fœtus femelle de lapine, une persistance des canaux de Wolff et de Müller a été observée. La testostérone seule ne permet donc pas la régression des canaux de Müller. Cette régression serait due à une autre substance intratesticulaire. Ainsi est née cette nouvelle hormone.

En 1969, Régine Picon a mis au point une technique pour doser cette substance, appelée *hormone anti-müllérienne* puis en 1972, Nathalie Josso a mis en évidence sa structure moléculaire (8). L'hormone sera ensuite purifiée en 1984 à partir de testicules de fœtus bovin grâce à des techniques d'immunochromatographie. Enfin, son gène est séquencé par Richard Cate à Boston en 1986 puis cloné par Jean-Yves Picard à Paris . Plus récemment, en 1994, les voies de signalisation de l'AMH ont été explorées et le récepteur de type II de l'AMH a été cloné (9).

I.2 Structure

Le gène de l'AMH comporte 2,75kbp et se divise en cinq exons. Il se situe sur le bras court du chromosome 19. Il code pour un précurseur, la prépro-AMH . Un clivage protéolytique entraîne la formation d'une protéine homodimérique de 110kDa en N-terminal et d'une autre de 25kDa en C-terminal. La section N-terminale a pour rôle de potentialiser l'activité du fragment en C-terminal qui, lui, sera biologiquement actif (10).

L'action de l'AMH est liée à deux types de récepteurs, présents dans les cellules mésenchymateuses: le récepteur de type I (AMH-RI), dont le poids moléculaire est de 55-60 kDa et est aussi connu comme « activin receptor-like kinase », et le récepteur de type II (AMH-RII), dont le poids moléculaire est plus important que celui du récepteur de type I (11).

L'AMH n'a pas d'affinité directe avec l'AMH-RI; elle se lie à son récepteur spécifique de type II, AMH-RII. Cette liaison au récepteur de type II permet la formation d'un grand complexe composé du dimère de la protéine AMH, deux particules d'AMH-RI et deux d'AMH-RII. Cette combinaison induit la phosphorylation de la tyrosine de l'AMH-RI et conduit à d'autres réactions au cours desquelles le complexe protéique SMAD (protéines impliquées dans la transduction du signal dans la cellule après l'activation du récepteur TGF- β) est transporté vers le noyau où il régule la transcription de certains gènes (**Figure 1**) (12).

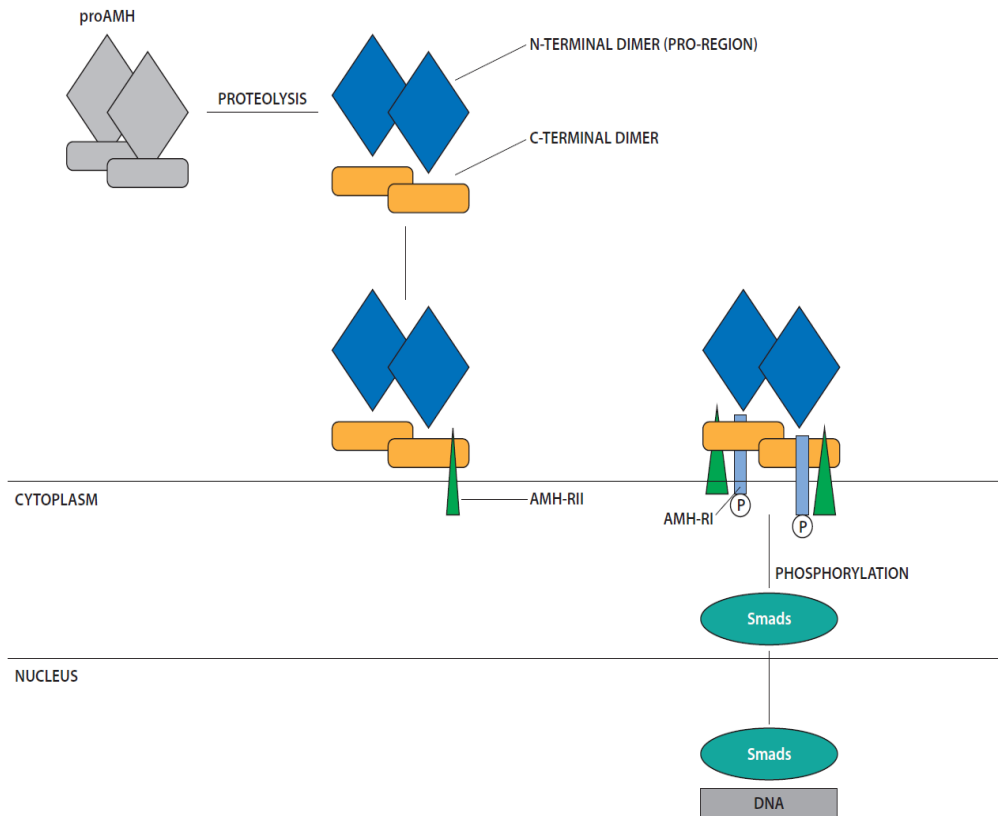


Figure 1. Représentation schématique de la structure d'AMH et de son mécanisme d'action au niveau cellulaire (12)

I.3 Synthèse

Chez la femme, l'AMH est sécrétée par les cellules de la granulosa des follicules ovariens primaires, pré-antraux et antraux précoces, à partir de la 36^{ème} semaine de vie intra-utérine jusqu'à la ménopause.

Approximativement 60 % de l'AMH circulante proviendrait des follicules entre 5,1 et 8 mm, les follicules inférieurs ou égaux à 5 mm ne contribueraient pas plus que 25 % et ceux supérieurs à 8 mm entre 15 et 20% (13).

Chez l'homme, l'AMH est sécrétée dans les testicules par les cellules de Sertoli, dès la différenciation sexuelle embryonnaire.

L'AMH serait donc potentiellement un indicateur de la présence testiculaire chez le garçon et de la fonction ovarienne chez la femme.

I.4 Embryogenèse

Chez les mammifères mâles, l'AMH empêche le développement des canaux de Müller dans l'utérus et d'autres structures müllériennes. (14) L'effet est ipsilatéral - chaque testicule supprime le développement müllérien seulement de son côté. Chez l'homme, cette action se déroule pendant les 8 premières semaines de gestation (15). Si aucune hormone n'est produite à partir des gonades, les canaux de Müller se développent automatiquement, tandis que les canaux de Wolff, qui sont responsables des parties reproductrices mâles, régressent automatiquement (16).

I.5 Mécanisme d'action de l'AMH

L'AMH agit en interagissant avec des récepteurs spécifiques sur les surfaces des cellules des tissus cibles (récepteurs de l'hormone anti-müllérienne). L'effet le plus connu et le plus spécifique, médié par les récepteurs de type II de l'AMH, comprend la mort cellulaire programmée (apoptose) du tissu cible (les canaux de Müller du fœtus). L'AMH est le seul ligand connu d'AMH-RII, ce qui suggère que les tissus qui expriment ce récepteur sont très probablement les tissus-cibles de l'AMH (17). A partir des années 2000, différents travaux ont relaté la présence du récepteur AMH-RII hors des gonades et notamment dans d'autres organes de la reproduction (glande mammaire, utérus et prostate) mais aussi dans le poumon fœtal et le cerveau. L'AMH-RII est en particulier exprimé dans les motoneurons de la moelle épinière, le cortex cérébral et l'hypothalamus, chez la souris (7).

Le rôle physiologique de l'AMH dans ces différents organes demeure mal connu. Elle pourrait contribuer au dimorphisme sexuel du développement cérébral. Ainsi, il a été rapporté que l'inactivation du gène codant l'AMH chez la souris mâle est associée à une féminisation partielle du comportement d'exploration (18).

Catteau-Jonard *et al.* ont étudié l'expression de la protéine AMH-RII par immunohistochimie dans le cerveau des souris en âge de procréer (90 jours après la naissance). Ils ont observé que les cellules immunoréactives pour l'AMH-RII sont distribuées dans l'hippocampe ainsi que dans les neurones hypothalamiques, libérant la GnRH qui contrôle la fonction de reproduction. Ils ont de plus trouvé que l'AMH-RII était exprimé dans les neurones à GnRH de fœtus humains. Chez les sujets adultes murins et humains, une approche par double immunomarquage révèle que l'AMH-RII continue à être exprimé par plus de 50 % des neurones à GnRH de la région pré-optique hypothalamique (19).

I.6 Rôle de l'AMH

I.6.1 Rôle de l'AMH dans la différenciation sexuelle

Le rôle de l'hormone dans la différenciation sexuelle a été mis en évidence initialement par les expériences de Jost. Par la suite, ces données ont été confirmées grâce à des modèles de souris transgéniques, d'une part, et, d'autre part, par l'analyse de patients présentant des troubles de la différenciation sexuelle (8).

Les souris transgéniques surexprimant l'AMH humaine ont une régression des dérivés müllériens avec une absence d'utérus et de vagin car ces organes dégénèrent (8). En pathologie, le syndrome de persistance des canaux müllériens (PMDS), c'est-à-dire l'existence chez un homme virilisé d'un utérus et/ou de trompes, est associée à une mutation perte de fonction de l'AMH ou du récepteur de type II. Ce syndrome illustre à nouveau le rôle de l'AMH dans le processus de différenciation des organes génitaux internes (20).

I.6.2 Rôle de l'AMH chez l'homme

Dans le sexe masculin, l'AMH est sécrétée par les cellules de Sertoli immatures du testicule embryonnaire lors de la vie intra-utérine, dès huit semaines de vie intra-utérine, et provoque une destruction irréversible des canaux de Müller, étape initiale de l'organogenèse du tractus génital. L'AMH s'élève ensuite rapidement après la naissance avec un pic à trois à six mois puis le taux se stabilise et perdure jusqu'à la puberté (1). À cette période, l'AMH est inhibée par la production de testostérone par les cellules de Leydig et dans une moindre mesure, par l'entrée en méiose des spermatocytes. Après la puberté, l'AMH continue à être exprimée dans les tubes séminifères par les cellules de Sertoli, en quantité beaucoup plus faible (13).

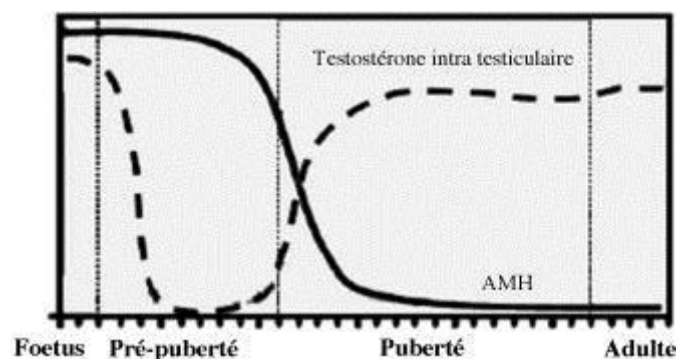


Figure 2. Variation du taux de testostérone intratesticulaire et de l'AMH plasmatique au cours de la vie. D'après Rodolpho Rey (8)

En fait, plus précisément, le taux diminue juste avant la puberté pour atteindre une valeur entre 2 et 5 ng/mL qui se maintient pendant la vie adulte (**Figure 2**) (1).

À la puberté, la polarité des cellules de Sertoli se modifie avec la formation de la barrière hémato-testiculaire et l'apparition de jonctions serrées entre les cellules de Sertoli. La sécrétion d'AMH devient alors luminale et non plus basale. On obtient alors une concentration plasmatique qui diminue au profit de celle du liquide séminal (10). Par conséquent, l'AMH est un marqueur utile de la fonction testiculaire chez les garçons prépubère. Son taux permet de déterminer l'existence de tissu testiculaire quand les gonades ne sont pas palpables et d'orienter le diagnostic lors d'une ambiguïté sexuelle, mais également de faciliter le diagnostic de troubles de la différenciation sexuelle, ou *disorder of sexual differentiation* (DSD) (1).

Chez l'adulte de sexe masculin, le rôle de l'AMH est mal connu. Elle pourrait présenter un intérêt en clinique chez des patients ayant une azoospermie de cause non obstructive. Fénichel *et al.* ont montré en 1999 que l'AMH pourrait prédire le résultat de la biopsie testiculaire chez des patients présentant une azoospermie non obstructive. En effet, la présence d'un taux bas d'AMH dans le liquide séminal serait corrélée à un nombre moindre de spermatozoïdes lors de la biopsie testiculaire (21).

1.6.2.1 Régulation du taux d'AMH chez l'homme

Plusieurs facteurs semblent intervenir dans la régulation de l'AMH chez l'homme. Le premier est la FSH qui entraîne une prolifération des cellules de Sertoli et donc une augmentation de l'AMH. Le deuxième facteur serait le taux de testostérone intra testiculaire. En effet, l'augmentation de la concentration de testostérone intra testiculaire durant la puberté est corrélée à la diminution de l'AMH. Les androgènes semblent exercer une régulation négative sur l'AMH, notamment en intra testiculaire. Il est admis aujourd'hui que la baisse du taux d'AMH est le reflet de l'élévation de la concentration intra testiculaire des androgènes et non celle de la concentration plasmatique en testostérone (10). Une étude a été menée chez des patients présentant un hypogonadisme hypogonadotrophique, patients qui ne sécrètent ni gonadotrophines ni testostérone. J. Young *et al.* ont administré à ces patients de la FSH recombinante (FSHrc) puis une association de FSHrc et de gonadotropine humaine (hCG) (22). Dans ce cas, la FSH stimule la production d'AMH dans le testicule prépubère (23).

1.6.2.2 Concentration sériques de l'AMH et fertilité chez l'homme

Aksglaede *et al.* ont mené une étude sur la qualité du sperme chez des jeunes hommes en bonne santé. Tous les participants ont fourni un échantillon de sperme et un échantillon de sang. On n'a rapporté aucune association entre la concentration sérique d'AMH et la qualité du sperme, à l'exception d'une association inverse significative entre l'AMH sérique et le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux. La concentration sérique d'AMH était associée positivement à la concentration sérique d'inhibine B et négativement associée à la concentration sérique de FSH. Les résultats indiquent donc une association positive entre l'AMH et la fonction des cellules de Sertoli et suggèrent que l'AMH sérique pourrait être un marqueur endocrine de la spermatogenèse, bien que cela ne se reflète pas directement dans la qualité du sperme (24).

Plus récemment, Andersen *et al.* ont mis en évidence une corrélation positive significative entre l'AMH totale dans le plasma séminal et la concentration de sperme, le nombre total de spermatozoïdes, la motilité totale des spermatozoïdes et la motilité progressive des spermatozoïdes. Par contre il n'y a aucune association entre l'AMH séminale et la morphologie normale (25). Cependant, certains hommes présentant une concentration séminale d'AMH faible ou indétectable avaient des concentrations de sperme supérieures à 15 millions/mL, ce qui indique que l'AMH peut ne pas être prédictif de la qualité du sperme au moins à de faibles concentrations d'AMH.

D'autres études sont nécessaires pour déterminer si l'association inverse entre l'AMH sérique et la morphologie des spermatozoïdes est directe ou si elle est causée par un deuxième facteur associé à l'AMH (24).

1.6.3 Rôle de l'AMH chez la femme

1.6.3.1 Physiologie ovarienne

Dans l'ovaire, les follicules apparaissent chez le fœtus au quatrième mois de grossesse, avec une réserve folliculaire à la naissance, constituée de 530 000 à 950 000 follicules. Avec le vieillissement, la réserve s'amenuise pour ne contenir qu'environ 200000 follicules à l'âge de 20 ans et moins de 20 000 à 40 ans. Le mécanisme principal est une involution par apoptose des petits follicules. La croissance folliculaire comporte plusieurs étapes (**Figure 3**).

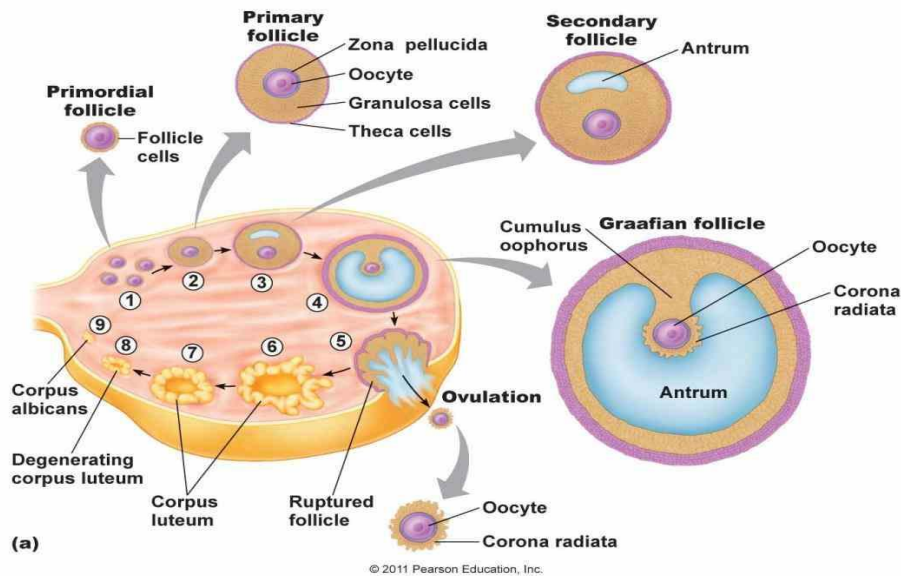


Figure 3. Structure de l'ovaire et croissance folliculaire.
D'après Pearson Education, 2011

La phase initiale consiste en l'entrée en croissance de follicules de manière permanente, de la vie intra-utérine à la ménopause. Au sein du pool de follicules de réserve, la majorité de ces follicules sont quiescents et une minorité rentre en croissance à chaque cycle en donnant naissance à des cohortes folliculaires. Cette entrée en croissance se fait par vague à tout moment du cycle, il s'agit de la vague de croissance folliculaire. Une seule vague par cycle produira un follicule ovulatoire. La phase de quiescence, gonadoindépendante, est régulée par plusieurs systèmes : système des IGFs, AMH, système inhibine-activine, système des interleukines ainsi que les systèmes des EGF, TGF et VEGF.

La deuxième étape permet la croissance folliculaire basale. Les follicules vont augmenter de taille pour devenir sélectionnables.

Enfin, la dernière étape est l'étape de maturation du follicule dominant qui aura été préalablement sélectionné (26).

Les follicules sont continuellement recrutés dans le pool de follicules quiescents – recrutement folliculaire initial et commencent à exprimer l'AMH et l'inhibine B. Après la puberté, à chaque nouveau cycle, un nombre limité de follicules est sélectionné dans ce bassin de petits follicules en croissance sous l'influence de la FSH, ce que l'on appelle le recrutement cyclique. A partir de cette cohorte de follicules croissants, un follicule est choisi pour la domination et ovule sous l'influence de la LH (**Figure 4**) (27). La majorité des

follicules en croissance est enlevée par l'atrésie, un processus apoptotique hormonocontrôlé. Il est par ailleurs à noter que les follicules atrétiques n'expriment pas l'AMH (28). Afin de sauver les follicules de l'atrésie, les niveaux de FSH doivent s'élever à une concentration seuil pour permettre la sélection FSH-dépendante d'un nombre limité de follicules. En conséquence du déclin continu des follicules primordiaux tout au long de la vie reproductive, le nombre de follicules croissants diminue également. On observe une augmentation progressive de son expression entre la naissance et la puberté (29). Par la suite, l'inhibine B sérique et les niveaux d'estradiol diminuent et entraîne par rétrocontrôle négatif l'élévation ménopausique caractéristique de la FSH et dans une moindre mesure de la LH (30).

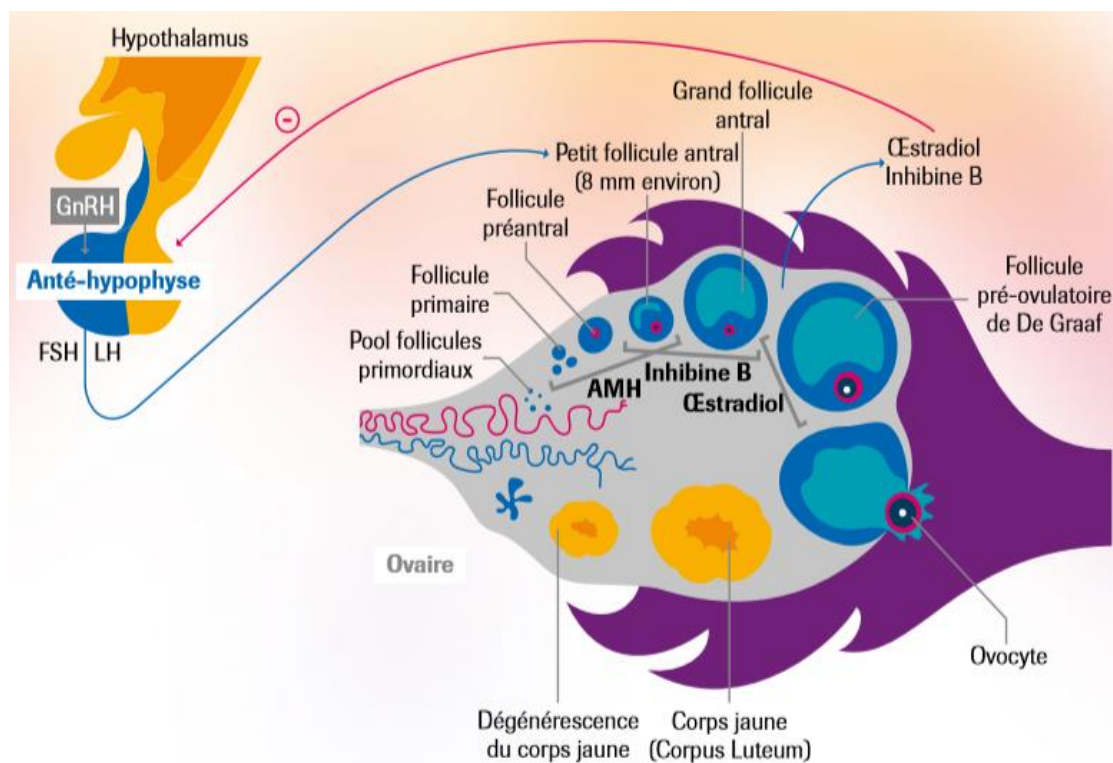


Figure 4. La folliculogénèse ; d'après Viser et al. 2012 (30)

I.6.3.2 Rôle de l'AMH dans la physiologie ovarienne

Le rôle de l'AMH chez la femme est de réguler négativement la transition des follicules primordiaux vers les follicules primaires (31) et de protéger les follicules en croissance d'une maturation prématurée, en s'opposant aux effets de la FSH (32). La sécrétion d'AMH par les cellules de la granulosa, s'initie dans la période périnatale et perdure jusqu'à la ménopause, période à laquelle les concentrations d'AMH deviennent indétectable (33).

L'AMH est exprimée dans une concentration importante et homogène par les follicules préantraux et les petits follicules antraux (4 à 6mm). En revanche elle n'est pas sécrétée par les follicules de réserve. Le taux d'AMH est donc fortement corrélé au nombre de follicules antraux et pré-antraux en croissance, qui est lui-même proportionnel au nombre de follicules primordiaux quiescents.

Elle diminue au fil de la croissance folliculaire et disparaît au stade de croissance folliculaire « FSH dépendante », c'est-à-dire au moment où les follicules deviennent sélectionnables. L'AMH est donc exprimée au sein des follicules qui ont été recrutés mais non sélectionnés. Elle régule ainsi le recrutement folliculaire et joue un rôle dans le maintien du pool de follicules primordiaux. Elle régule également le processus de croissance folliculaire en diminuant la sensibilité à la FSH par réduction de l'expression de l'aromatase et du nombre de récepteurs à la LH des cellules de la granulosa (**Figure 5**) (34).

L'analyse des ovaires de souris femelles dont le gène de l'AMH a été invalidé (AMH-KO), a révélé que l'AMH inhibe le recrutement initial de follicules ainsi que la phase de sélection folliculaire FSH-dépendante. En l'absence d'AMH, les follicules primordiaux sont recrutés à un rythme plus rapide que la normale, ce qui a entraîné la présence de deux à trois fois plus de follicules en croissance, et nettement moins de follicules primordiaux à 4 mois par rapport aux souris de type sauvage. En conséquence de ce taux de recrutement accru, les ovaires des souris AMH-KO cessent leur fonction ovarienne plus tôt que ceux des souris de type sauvage. Les ovaires de souris AMH-KO âgées de 13 mois étaient presque dépourvus de follicules primordiaux, alors que les ovaires de souris de type sauvage du même âge contenaient encore des follicules (30).

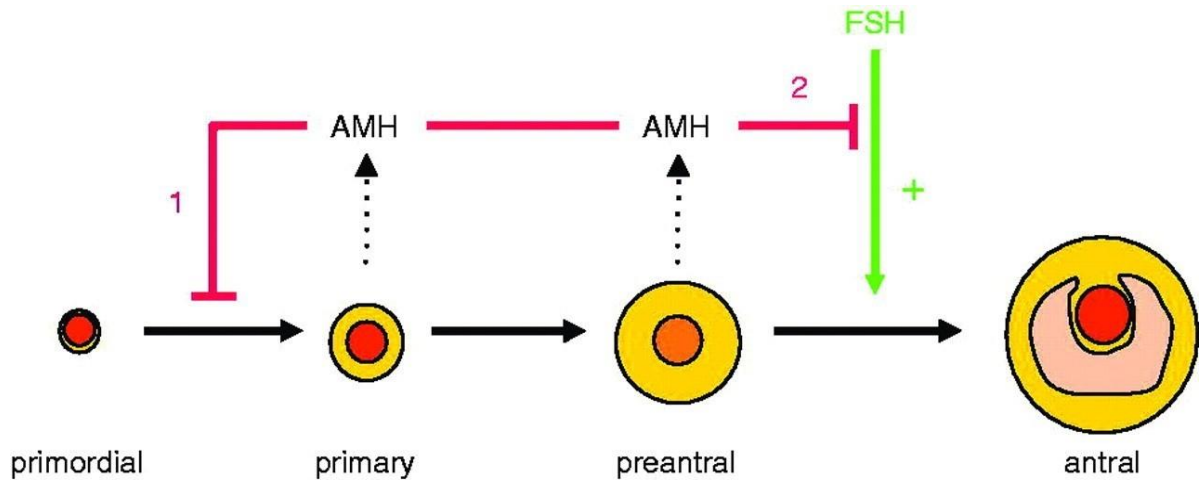


Figure 5. Action régulatrice de l'AMH sur l'ovaire (28)

(1) l'AMH inhibe le recrutement initial et (2) l'AMH inhibe l'effet stimulateur de la FSH sur la croissance des follicules préantraux et antraux

In vitro, les follicules ont une sensibilité accrue à la FSH en l'absence d'AMH, et *in vivo*, les souris AMH-KO traités par antagoniste du GnRH et FSH ont plus de follicules en croissance que les souris sauvages (35). En l'absence d'AMH, le recrutement cyclique de petits follicules antraux a été augmenté en dépit d'une hausse de la FSH (36). Cette sensibilité accrue des follicules à l'FSH a également eu comme conséquence la sélection des grands follicules préantraux, qui normalement ne sont pas sensibles au recrutement cyclique (30).

L'effet inhibiteur de l'AMH sur le recrutement primordial de follicules a été confirmé utilisant des systèmes de culture ovarienne *in vitro* ou des expériences ovariennes de greffe dans plusieurs espèces, y compris des humains (37).

Yan *et al.* ont mené une étude chez des femmes âgées de 26 à 41 ans qui ont fait don de petits spécimens de biopsie corticale ovarienne, lors des examens gynécologiques de routine ou laparoscopies gynécologiques. Les morceaux de tissus étaient soit directement fixés pour les analyses histologiques (contrôle non cultivé au jour 0) ou placés dans des inserts de culture de tissus pendant 7 jours, cultures parallèles du même spécimen de biopsie (37). Les inserts de culture de tissus ont été recouverts de 100 µl de facteur réduit de croissance de la matrice extracellulaire. Les suppléments complémentaires étaient de la FSH humaine recombinante, de l'insuline, transferrine, sélénite de sodium et 0,5% d'antibiotiques/solution antimycosiques. Pour tester la dose-réponse à l'AMH, on a ajouté de l'AMH recombinante de souris (rrAMH) aux milieux de culture, à quatre concentrations différentes: 10, 30 et 100 ng/mL. Deux milieux de contrôle ne contenant pas d'AMH ont été inclus dans les cultures.

Les cellules ont été analysées après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. Les follicules ont été comptés et classés selon leurs états de développement. Les follicules contenant une seule couche de cellules de granulosa aplatie ont été considérés comme primordiaux, ceux ayant les cellules granuleuses cuboïdes en une seule couche ont été identifiés comme primaires et ceux ayant deux ou plusieurs couches de cellules granuleuses cubiques, classés comme secondaires.

Les proportions moyennes des stades de développement des follicules ont considérablement changé au cours de la période de culture de 7 jours pour la plupart des groupes par rapport aux tissus témoins frais non cultivés . Par rapport aux contrôles non cultivés, tous les tissus cultivés, à l'exception de ceux contenant 100 ng/mL d'AMH, avait significativement moins de follicules primordiaux (**Figure 6 et 7**) (37).

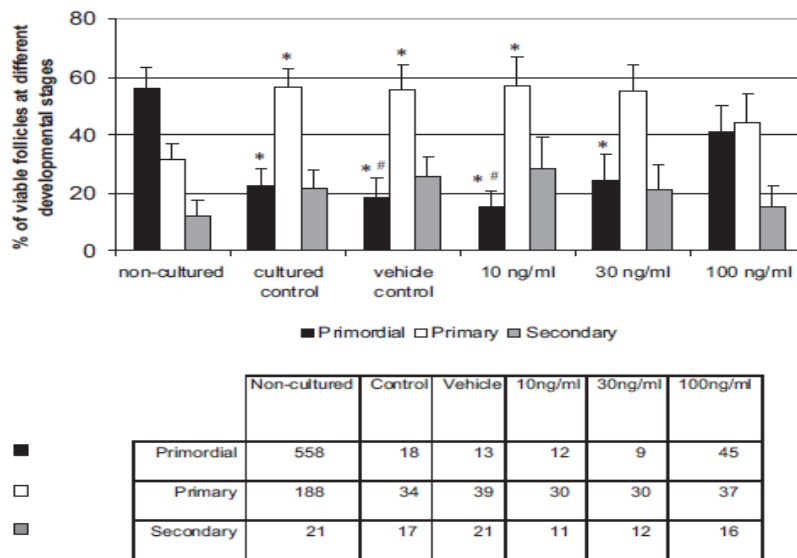


Figure 6. Proportions de follicules viables aux niveaux primordial, primaire et stades secondaires de développement

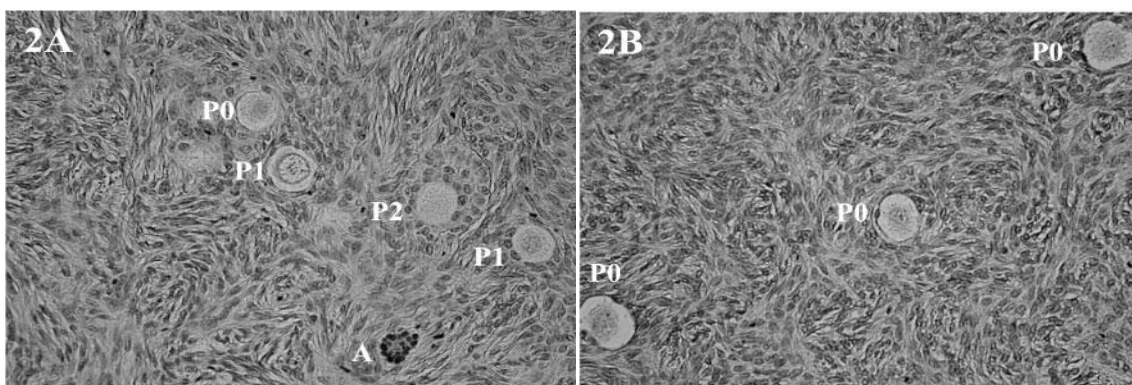


Figure 7. Vue histologique typique du tissu ovarien

Milieu témoin (2A) ou en présence de 100 ng/mL d'AMH (2B) ; P0, primordial; P1, primaire; P2, secondaire et A, follicule atrétique à un grossissement de 200 (37).

En conclusion l'AMH régule négativement la transition des follicules primordiaux vers les follicules primaires et donc protège les follicules en croissance d'une maturation prématurée, en s'opposant aux effets de la FSH.

I.7 Variations des concentrations d'AMH

I.7.1 AMH en fonction de l'âge

La première méta-analyse, publiée en 2011 par Kelsey *et al.*, portait sur 3 000 dosages d'AMH sérique chez des femmes âgées de 0,3 à 51,3 ans (38).

Les auteurs ont établi un nomogramme de l'AMH en fonction de l'âge qui décrivait une augmentation de cette hormone pendant les premiers mois de la vie, suivie d'une brève chute qui précède une ré-augmentation qui ne se fera qu'après l'âge de deux ans (**Figure 8**) (20). Ces variations pendant les premiers mois de la vie seraient liées à l'existence d'une mini-puberté chez la petite fille en période néonatale (39). Ce phénomène correspond à une activation de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique qui induit une augmentation transitoire des gonadotrophines (29).

Enfin, la majorité des études rapporte un pic d'AMH chez la femme entre 16 et 25 ans, puis une baisse de concentration progressive jusqu'à la ménopause (40) . Cette diminution reflète la perte progressive du pool de follicules primordiaux et le déclin des fonctions reproductives (41). Plusieurs études ont par ailleurs montré la capacité de l'AMH à prédire la transition vers la ménopause (42).

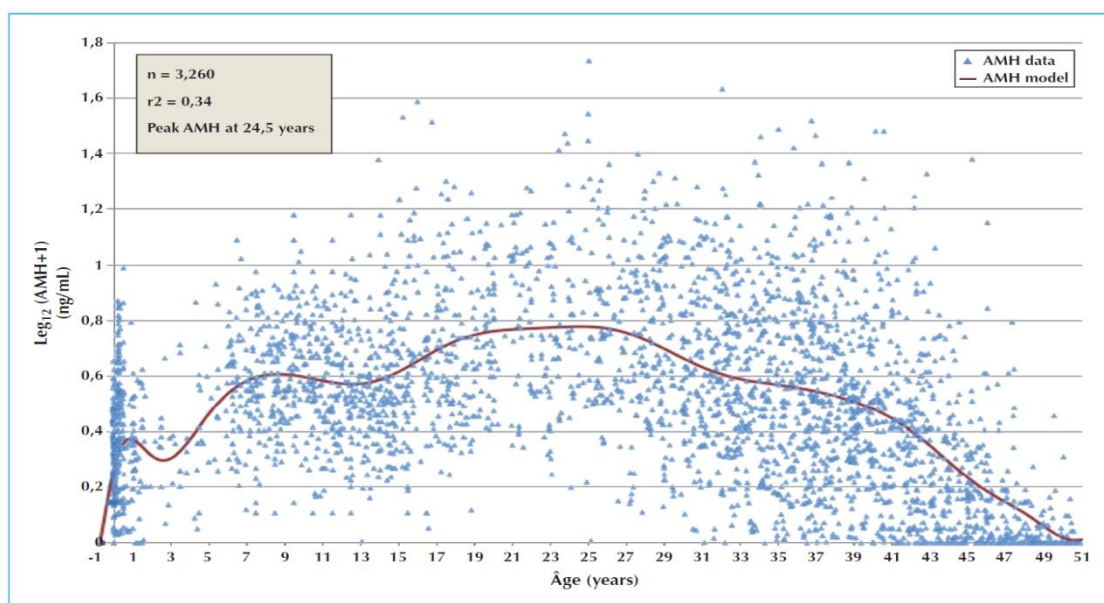


Figure 8. Variation physiologique de l'AMH en fonction de l'âge (29)

1.7.2 AMH et facteurs environnementaux

Les variations de l'AMH au cours de la vie sont également liées au mode de vie et aux certains facteurs exogènes. Ainsi dans une étude chez plus de 2000 femmes, Dolleman *et al.* observent une diminution du taux d'AMH chez les femmes sous contraception oestro-progestative, chez les fumeuses, lors de la grossesse (43), ou lors d'hypogonadisme hypogonadotrophique où les concentrations seraient environ 20% plus basses (44). Le mécanisme physiopathologique sous-jacent serait une diminution de la masse des cellules de la granulosa productrices d'AMH en rapport avec l'effondrement de la FSH induit par les oestro-progestatifs (45) (**Figure 9**). Cette diminution semble réversible après l'arrêt de la pilule, du tabac et en post-partum.

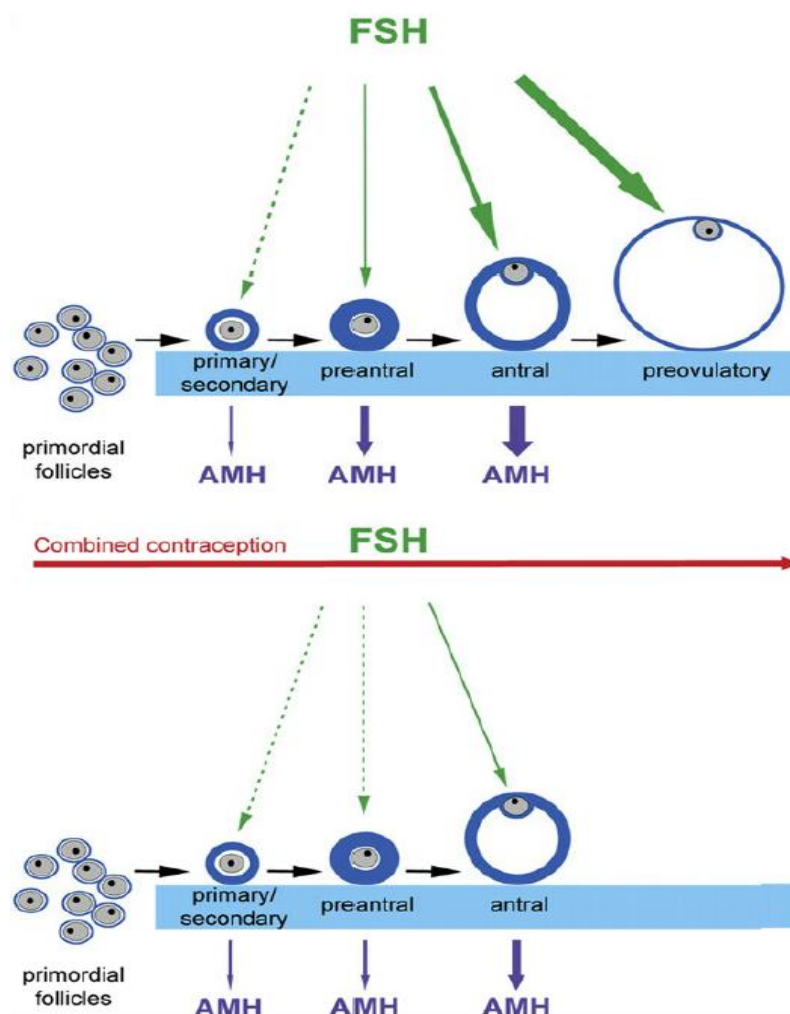


Figure 9. Effet de la FSH sur la croissance des follicules et sur la sécrétion d'AMH dans l'ovaire, avec ou sans utilisation de la pilule contraceptive

La consommation de tabac a un impact connu sur la réserve ovarienne en accélérant la déplétion folliculaire (46). Cependant, des effets contradictoires ont été rapportés concernant la relation entre le tabac et l'AMH, certains auteurs constatant une diminution de l'AMH avec le tabac (47) alors que d'autres n'observent aucune variation (48).

Les concentrations physiologiques d'AMH pourraient également varier en fonction des ethnies. En effet, deux études ont observé des valeurs d'AMH sériques 25 % plus basses pour une même tranche d'âge, chez les femmes hispaniques et noires comparativement aux caucasiennes. En outre, un pourcentage assez inattendu d'AMH à des taux indétectables a été observé chez des femmes noires jeunes, et ce malgré la persistance de cycles réguliers. Ces données suggèreraient que, dans des populations spécifiques, la mesure de l'AMH pourrait ne pas être fiable pour prédire la réserve ovarienne (44).

1.7.3 AMH au cours du cycle menstruel

Il y a des nombreuses études qui rapportent des variations intra-individuelle d'AMH sérique au cours du cycle menstruel. Une large majorité indique néanmoins une remarquable stabilité inter-cycle et intra-cycle de l'AMH (49), ce qui n'est pas le cas des autres marqueurs hormonaux usuels du statut folliculaire ovarien (FSH, estradiol, inhibine B) (44).

Cette spécificité s'explique vraisemblablement par le fait que l'AMH est produite par un large éventail de follicules, avec une sécrétion qui s'amenuise lorsque le diamètre folliculaire dépasse 8 mm. Ainsi, les taux d'AMH ne sont pas influencés par le développement du follicule dominant, et la mesure de cette hormone quelle que soit la phase du cycle menstruel, donne une information sur le nombre de petits follicules antraux disponibles pour le recrutement folliculaire cyclique (29).

Par ailleurs, il est important de noter que, bien que l'AMH soit un marqueur pertinent du statut folliculaire ovarien, son dosage sérique n'est en aucun cas prédictif de la fertilité naturelle (50) ou médicalement assistée (51).

II. Dosages de l'AMH

II.1 Méthodes de dosage

II.1.1 Milieux biologiques

Un dosage d'AMH peut être réalisé dans trois milieux biologiques : le sérum sanguin, qui constitue le milieu de dosage de référence, le liquide folliculaire ovarien et le liquide séminal (52).

Initialement étudiée pour son rôle dans la différenciation testiculaire, l'AMH fut mesurée pour la première fois en 1990. De ce fait, les trois premiers tests développés, par Baker *et al.*, Hudson *et al.* et Josso *et al.*, avaient pour but de mesurer l'AMH sérique en tant que marqueur de la fonction testiculaire pendant l'enfance (3). Depuis, les techniques ont beaucoup évolué et trois générations de dosages se sont succédées. La première et deuxième génération sont des dosages manuels. L'automatisation fait apparaître les tests dits de troisième génération (52).

II.1.2 Les techniques de dosage

II.1.2.1 Première génération

La première technique commercialisée fut celle développée par Josso *et al.*. Cette technique de type ELISA ultrasensible, connue internationalement sous le nom de kit IOT AMH, et sous le nom de kit EIA AMH/MIS en France, est disponible dans le commerce depuis 1997 grâce à la société Beckman Coulter (3).

L'utilisation plus fréquente du dosage de l'AMH chez les femmes en âge de procréer dans les années 2000 impulsa le développement d'une technique de dosage type ELISA supplémentaire commercialisée depuis 2004 par Diagnostic System Lab (Webster, Texas, USA), le kit DSL (3).

Ces deux dosages ont été conçus avec deux anticorps différents et avec différents standards (53). Par conséquent, les valeurs obtenues différaient sensiblement, le kit IOT donnant des concentrations d'AMH 30 % plus élevées dans la plupart des cas (54), ce qui posait encore plus de problèmes étant le fait que les valeurs de référence n'étaient pas les mêmes.

II.1.2.2 *Deuxième génération*

Après avoir acquis Diagnostic Systems Lab en 2005, Beckman Coulter a développé la première technique de dosage de deuxième génération, l'AMH Gen II ELISA, commercialisée à partir de 2009. Le kit AMH Gen II (aussi appelé kit AMH Gen II original) utilisait l'anticorps du kit DSL et les standards du kit IOT. Cette trousse était commercialisée en Europe et aux États-Unis. Les divergences observées entre les kits de première génération et le kit AMH Gen II ont entraîné le retrait de ce dernier du marché en juillet 2013 suivi par l'introduction du kit AMH Gen II modifié en août 2013 (55). La nouveauté de ce kit modifié était basée sur le mélange préliminaire du calibrateur, du contrôle ou du sérum et du tampon échantillon sur la plaque ELISA au lieu d'une étape séquentielle comme dans le kit original (52).

Deux nouveaux kits de deuxième génération ont été mis en vente par AnshLabs (Webster, Texas, USA): le kit AnshLabs Ultrasensible AMH/MIS ELISA mis en vente en 2012 et le kit AnshLabs picoAMH ELISA en 2013 (56).

II.1.2.3 *Troisième génération*

C'est à partir de 2014 qu'apparaissent les premiers tests automatisés pour les dosages d'AMH. Les tests deviennent accessibles dans la gamme ACCESS de Beckman Coulter et ELECSYS AMH chez Roche Diagnostics. Ces deux kits utilisent l'anticorps du kit AMH Gen II. Le kit ACCESS est un dosage en sandwich avec chimiluminescence. Le kit ELECSYS utilise une technique par électrochimiluminescence (ECLIA) (52).

D'après l'analyse de la littérature, actuellement, ces trois générations sont présentes sur le marché. Les kits EIA AMH/MIS2, AMH Gen II, AnshLabs AMH/MIS, AnshLabs picoAMH, ACCESS AMH et ELECSYS AMH sont commercialisés et bénéficient du marquage CE (52).

Les tests de dosage d'AMH automatisés ont de meilleures performances pré-analytiques et analytiques que les tests manuels. En absence de standard international, l'interprétation des valeurs d'AMH doit être réalisée en fonction de la technique utilisée (52).

II.2 Valeurs de référence

En l'absence de standard international disponible et du fait de calibrations différentes, les résultats obtenus par les différentes techniques de dosage ne sont pas identiques. Les valeurs seuil publiées dans la littérature jusqu'à ce jour sont donc technique-

dépendantes. Les conseils nationaux professionnels médicaux insistent fermement sur la nécessité de mettre en place un standard international afin de faciliter le développement de valeurs de référence, diminuer la variabilité inter-laboratoire et le coût dû aux dosages répétés ainsi que pour améliorer la sécurité des patients en évitant la mauvaise estimation des valeurs.

Enfin, le Conseil national professionnel de biologie médicale recommande d'exprimer les résultats du dosage de l'AMH dans les deux unités (ng/mL et pmol/L) qui peuvent être utilisées et conseille de se reporter aux préconisations du fournisseur de la trousse de dosage pour les conditions préanalytiques et analytiques à respecter, ainsi que d'interpréter les valeurs selon la technique de dosage utilisée (52).

III. Intérêts cliniques de l'AMH

III.1 Intérêt chez la femme

L'Observatoire épidémiologique de la fertilité en France (Obseff) a estimé que 12 mois après le début d'une période sans contraception, 24% des couples n'avaient pas obtenu de grossesse ni repris de contraception (57).

Il est admis aujourd'hui que l'AMH doive entrer dans tous les bilans biologiques d'exploration de l'infertilité, étant considérée comme le meilleur marqueur biologique pour évaluer la réserve ovarienne (3)(58). Son dosage est très utilisé en assistance médicale à la procréation car le taux d'AMH plasmatique reflète le nombre de follicules en croissance (59).

III.1.1 AMH et grossesse

III.1.1.1 Réserve ovarienne et réponse à la stimulation

L'évaluation de la réserve ovarienne est considérée comme un paramètre important dans le bilan de fertilité des femmes. Elle est représentée par le stock de follicules primordiaux. De plus, elle est corrélée au nombre d'ovocytes qui pourront être recueillis. L'âge est un marqueur incontournable dans l'évaluation de la réserve ovarienne en raison du vieillissement physiologique.

Un certain nombre de marqueurs hormonaux tels que la FSH, l'E2 et l'inhibine B ont aussi été identifiés comme marqueurs de la réserve ovarienne (60) pour la prédiction d'une réponse à la stimulation. Cependant, ces mesures présentent une valeur prédictive limitée

souvent parce qu'elles sont des mesures indirectes de la réserve ovarienne (FSH et E2), ou ont une variabilité inter-cycles substantielle (FSH) ou encore présentent une grande variabilité intra-cycle (FSH, E2, inhibine B) (60).

Le compte de follicules antraux entre 2 et 10 mm visibles en échographie pelvienne est également largement utilisé comme marqueur de la réserve ovarienne. Le nombre de follicules antraux au 3^{ème} jour possède une valeur prédictive des réponses ovariennes faible et excessive. Il s'agit d'une procédure non invasive, simple et avec des résultats immédiats. Toutefois, la valeur prédictive de la réponse ovarienne du CFA peut être diminuée compte tenu du caractère opérateur-dépendant (détermination subjective, différences de formation, de méthodologie utilisée). À cela s'ajoute les différences de technologie en termes de résolution des ultrasons. De plus, le CFA aurait tendance à surestimer le nombre de follicules antraux car il prendrait en compte aussi les follicules atrétiques visibles. Enfin, la valeur prédictive serait diminuée chez les femmes obèses et en surpoids chez lesquelles les performances de l'échographie sont diminuées (61).

L'AMH est considérée aujourd'hui comme le meilleur marqueur biologique pour évaluer la réserve ovarienne car le taux d'AMH plasmatique reflète le nombre de follicules en croissance pré-antraux et antraux dans les ovaires, ayant l'avantage d'être stable au cours du cycle menstruel (**Figure 10**) (60).

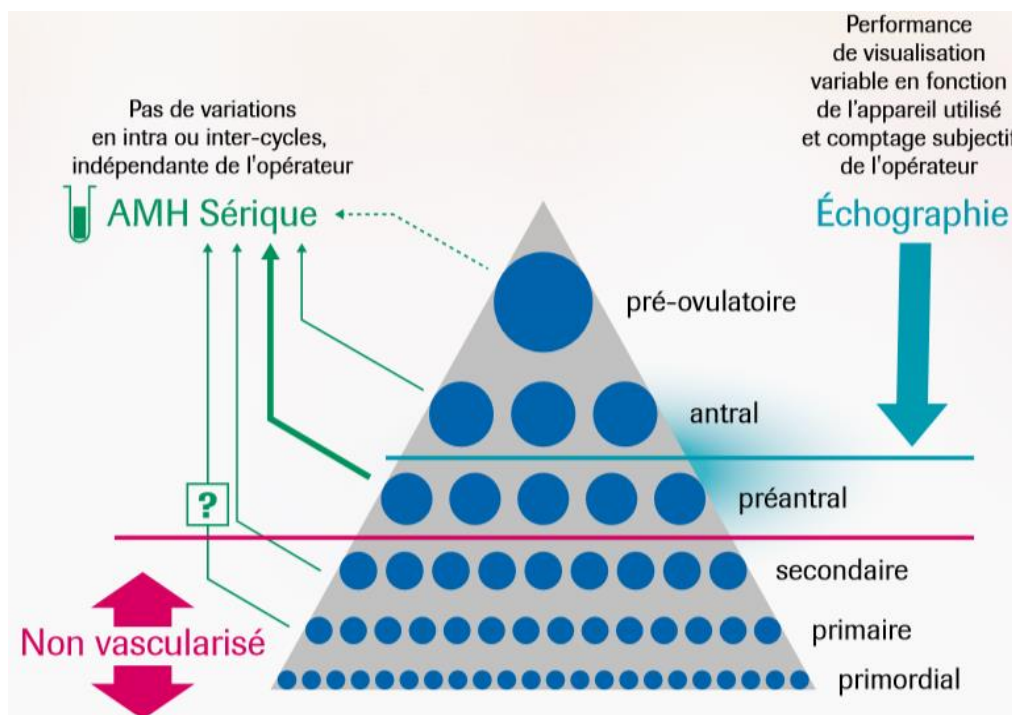


Figure 10. AMH et compte de follicules antraux ; d'après Dewailly et al. 2014 (3)

En France, il est estimé qu'environ un couple sur cinq en âge de procréer consulte un professionnel de la fertilité, 140 000 femmes/an font appel à la procréation médicalement assistée dont 60 000 effectuent une fécondation in vitro (52). L'induction de l'ovulation et les techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) sont destinées avant tout à remédier à ces problèmes d'infertilité dans un couple.

L'induction de l'ovulation stricto sensu (induction mono-ou pauci-folliculaire) désigne la pratique médicale qui consiste à stimuler la croissance et la maturation folliculaire pour permettre l'ovulation d'un ou quelques follicules chez une femme qui n'ovule pas normalement (ovulation mono-ou pauci-folliculaire). Ce traitement est indiqué dans le cas d'infertilité par anomalie de l'ovulation chez la femme afin d'obtenir une grossesse mono-fœtale évolutive.

L'induction mono-ou pauci-folliculaire est également utilisée pour l'insémination intra-utérine. L'induction pluri-folliculaire, quant à elle, maintient la croissance de la cohorte folliculaire (naturellement) recrutée pour obtenir un maximum de follicules pré-ovulatoires et par conséquent d'ovocytes fécondables. L'induction pluri-folliculaire est réservée à la fécondation in vitro (FIV) car c'est la seule technique d'AMP qui permet de maîtriser le risque de grossesse multiple en limitant le nombre d'embryons transférés.

La signification de la réserve ovarienne est importante surtout parce qu'elle permet de prédire les cas extrêmes de réponse à la stimulation ovarienne.

Une réponse ovarienne faible correspond à la non-obtention du nombre d'ovocytes appropriés pour un pronostic favorable (e.g. ≤ 3 ovocytes dans le cas d'une patiente soumise à une stimulation hormonale conventionnelle avant FIV) (62). Les patientes risquant ne pas répondre suffisamment à la stimulation ont des chances de grossesse plus faibles. La prédiction d'une réponse ovarienne faible est vitale pour pouvoir conseiller les couples.

Une réponse ovarienne excessive exposant les patientes au syndrome d'hyperstimulation ovarienne (SHSO).

Le SHSO est une complication potentiellement grave de la stimulation ovarienne. Le SHSO est cliniquement caractérisé par une distension abdominale en raison de l'augmentation du volume ovarien avec une augmentation soudaine de la perméabilité vasculaire, ce qui entraîne une extravasation des liquides vers le secteur extravasculaire. Ceci peut provoquer la formation d'un troisième secteur du péritoine, de la plèvre ou du péricarde pouvant donner comme manifestations cliniques l'épanchement abdominal (augmentation rapide du poids, du périmètre ombilical, sub-occlusion), pleural (difficultés respiratoires, tachypnée) ou péricardique (tachycardie).

Le meilleur traitement du SHSO passe par sa prévention. Elle implique le dépistage des terrains favorisant une réponse ovarienne excessive et la maîtrise des techniques de stimulation ovarienne (**Figure 11**) (52).

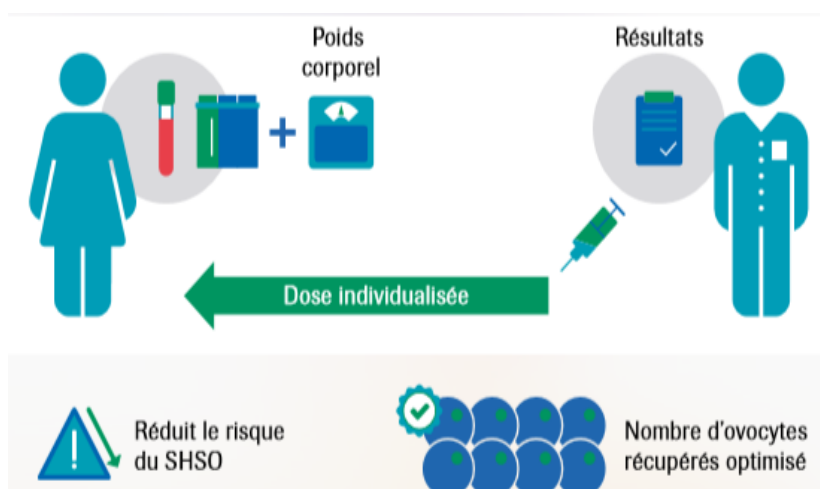


Figure 11. Prise en charge personnalisée de la stimulation ovarienne (63)

Dans ce contexte, le dosage de l'AMH sérique viendrait concurrencer le CFA (qui fait partie de l'échographie vaginale au troisième jour du cycle menstruel) puisque son taux est fortement corrélé à ce paramètre et d'un point de vue théorique, reflèterait la croissance folliculaire sur une plus large plage (52).

*Les avantages théoriques de l'utilisation de l'AMH comme marqueur prédictif de la réponse ovarienne à la stimulation incluent la stabilité de son taux sérique au cours du cycle menstruel, sa reproductibilité d'un cycle à l'autre et sa relative indépendance par rapport à l'axe hypothalamo-hypophysaire (**Figure 12**) (60)(61).*

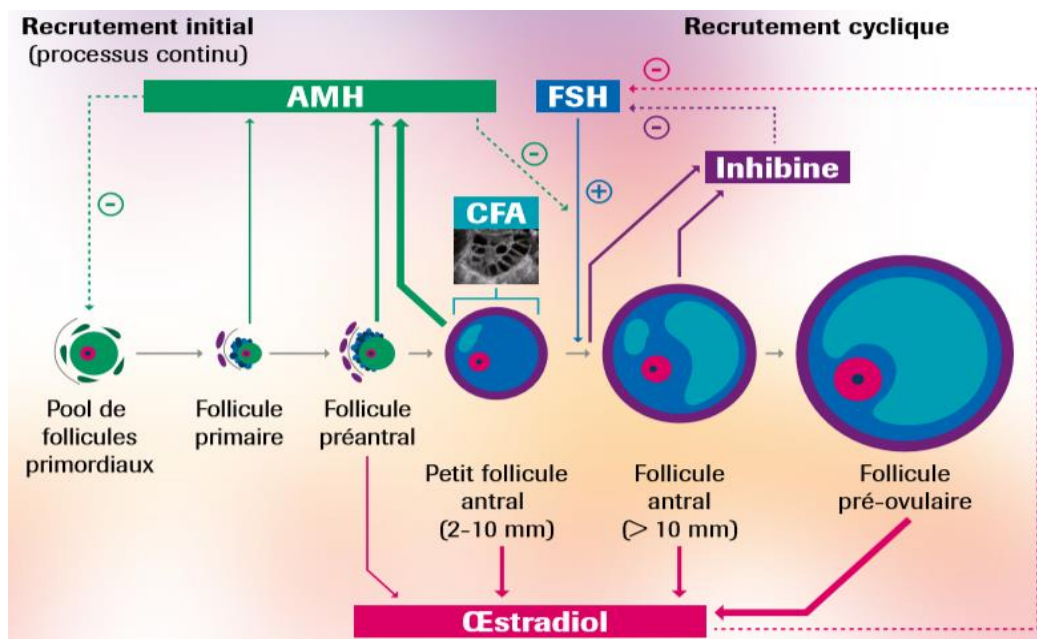


Figure 12. : Sécrétion d'AMH durant la folliculogénèse; d'après Dewailly et. al 2014 (3)

III.1.1.2 AMH et résultats du traitement par citrate de clomifène - corrélation

Le citrate de clomifène est un antiœstrogène utilisé dans le cadre d'une infertilité liée à des troubles d'ovulation. Il se fixe sur les récepteurs des œstrogènes sur l'hypothalamus et l'hypophyse et les empêchent ainsi de freiner la sécrétion de FSH et de LH. Il peut être prescrit isolément ou en même temps qu'une démarche d'insémination artificielle ou de fécondation in vitro.

Coskun B. *et al* ont étudié la valeur des taux d'AMH dans la prédiction de la réponse à l'administration de citrate de clomifène chez 100 patientes présentant une infertilité inexplicée et ont analysé la corrélation entre le taux de follicules antraux et l'AMH sérique, la FSH et l'œstradiol au troisième jour du cycle de traitement (64) .

Tableau 1. Valeurs de signification statistique et AUC de l'AMH et du CFA

	Couper	ROC AUC	IC 95%	valeur p	Sensibilité	Spécificité
AMH (ng / ml)	2,78	0,862	0,791-0,933	0,001	74%	86%
AFC	14	0,792	0,711-0,883	0,001	68%	80%

La courbe ROC a été établie pour les niveaux d'AMH et de CFA en calculant la sensibilité et la spécificité d'AMH et de CFA pour montrer la réponse à l'administration de citrate de clomifène. Les valeurs de l'AMH et de CFA se sont avérées significativement utiles pour prédire la réponse au citrate de clomifène. L'aire sous la courbe (AUC) était de 0,862 pour AMH, alors qu'elle était de 0,792 pour le CFA. Dans cette étude, AMH présentait une plus grande surface sous la courbe ROC que le CFA. Par conséquent, l'AMH était plus efficace pour prédire la réponse au citrate de clomifène (**Tableau 1**) (64).

Dans cet étude, Coskun *et al.* montre qu'une valeur seuil de 2,78 ng/mL pour l'AMH s'est avérée optimale pour prédire la réponse au traitement par citrate de clomifène pour l'induction de l'ovulation chez les patients présentant une fertilité inexplicée et ils recommandent d'utiliser la gonadotrophine pour l'induction de l'ovulation à des valeurs inférieures à cette valeur seuil. La mesure de routine du taux sérique d'AMH peut être utile pour l'individualisation du traitement chez des patientes infertiles. Cependant, en raison du nombre limité de patientes recrutées pour l'étude, des études prospectives et randomisées supplémentaires sont nécessaires avec des groupes de patientes plus importants (64).

III.1.1.3 AMH ou FSH comme facteurs prédictifs de la naissance

Dans une petite étude prospective de 350 cycles de FIV, Gleicher *et al.* ont rapporté l'impact discordant entre l'AMH et la FSH sur le rendement en ovocytes (65). Une AMH normale avec une FSH anormale prédit un rendement en ovocytes plus élevé qu'une FSH normale avec une AMH anormale. Bien qu'il y ait eu des différences en fonction de l'âge, l'AMH s'avère un meilleur prédicteur clinique du rendement en ovocytes (66).

Dans l'étude de Wang S. *et al* sur environ 13 000 cycles de FIV, un AMH rassurant a prédit un taux de natalité plus élevé parmi les cycles discordants, suggérant de même qu'un AMH normal est un meilleur prédicteur clinique du succès du cycle lorsqu'AMH et FSH sont discordants.

Bien que les deux présentent une utilité clinique évidente pour la prévision du pronostic chez les patients atteints d'infertilité, les marqueurs évalués seuls ou pris ensemble ne suffisent pas pour prédire la probabilité d'une naissance vivante pour le patient. Des modèles de prévision intégrant ces marqueurs en plus des données démographiques sur le patient et des informations sur la réponse au traitement sont nécessaires pour fournir des conseils pronostiques précis aux spécialistes de l'infertilité afin de faciliter le conseil du patient (66).

III.1.1.4 AMH et qualité embryonnaire

Bien qu'il soit le meilleur marqueur biologique pour évaluer la réserve ovarienne on s'est intéressé à la valeur prédictive de l'AMH vis-à-vis des chances d'obtention d'embryons et de l'initiation d'une grossesse.

Morin SJ *et al.* ont relevé une question par rapport à la qualité ovocytaire des femmes infertiles âgées de moins de 38 ans et présentant des preuves quantitatives d'une réserve ovarienne diminuée et/ou d'une réponse médiocre à la stimulation. Ils ont mené une étude afin de découvrir si les patientes candidats présentaient également une qualité ovocytaire médiocre, mesurée par les taux de blastulation, d'aneuploïdie et de natalité vivante (67).

Deux comparaisons ont été effectuées chez environ 3000 patientes répondant aux critères d'inclusion: l'évaluation du précycle de la réserve ovarienne (sur la base du taux d'AMH) et la réserve d'ovocytes après le cycle. Pour chaque comparaison, les patients du <10^{ème} percentile ont été comparés aux patients de l'intervalle interquartile (IQR) en ce qui concerne le taux de blastulation, le taux d'aneuploïdie et le taux de naissance vivante. Un modèle à effets mixtes a été réalisé pour contrôler l'âge de la femme et pour contrôler la corrélation entre les ovocytes et les embryons de la même cohorte de patientes.

Les patientes dont le taux d'AMH avant le cycle est inférieur au 10^{ème} percentile ont des rendements en ovocytes inférieurs à ceux du 25^{ème} au 75^{ème} percentile. Cependant, sur le modèle à effets mixtes, un ovocyte fécondé avec succès provenant d'une patiente avec AMH au <10^{ème} percentile a les mêmes chances de former un blastocyste de qualité, d'être euploïde et de produire une naissance vivante après le transfert d'un blastocyste euploïde (**Figure 13**) (67).

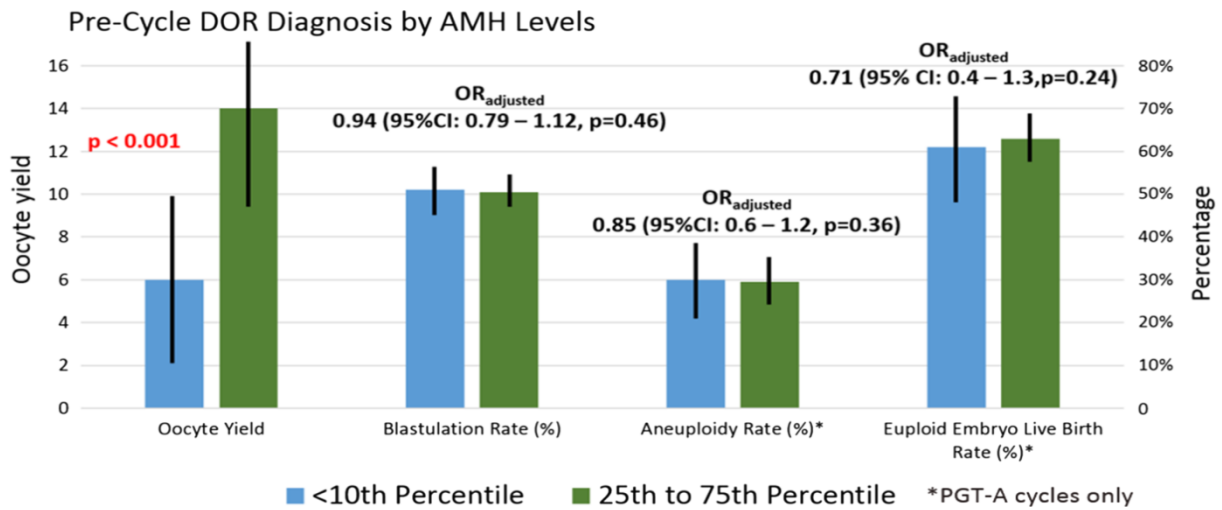


Figure 13. Diagnostic de l'insuffisance ovarienne par niveaux d'AMH, en pré-cycle FIV

Bien que dérivé d'un cycle avec une réponse significativement plus faible, un ovocyte récupéré d'un cycle avec un rendement d'ovocytes dans le <10^{ème} percentile a les mêmes chances d'être euploïde et de produire une naissance vivante après le transfert d'un embryon euploïde, sur le modèle à effets mixtes. Les chances ajustées de former un blastocyste de haute qualité étaient plus élevées pour un ovocyte fécondé avec succès récupéré dans un cycle de faible réponse ovarienne (**Figure 14**) (67).

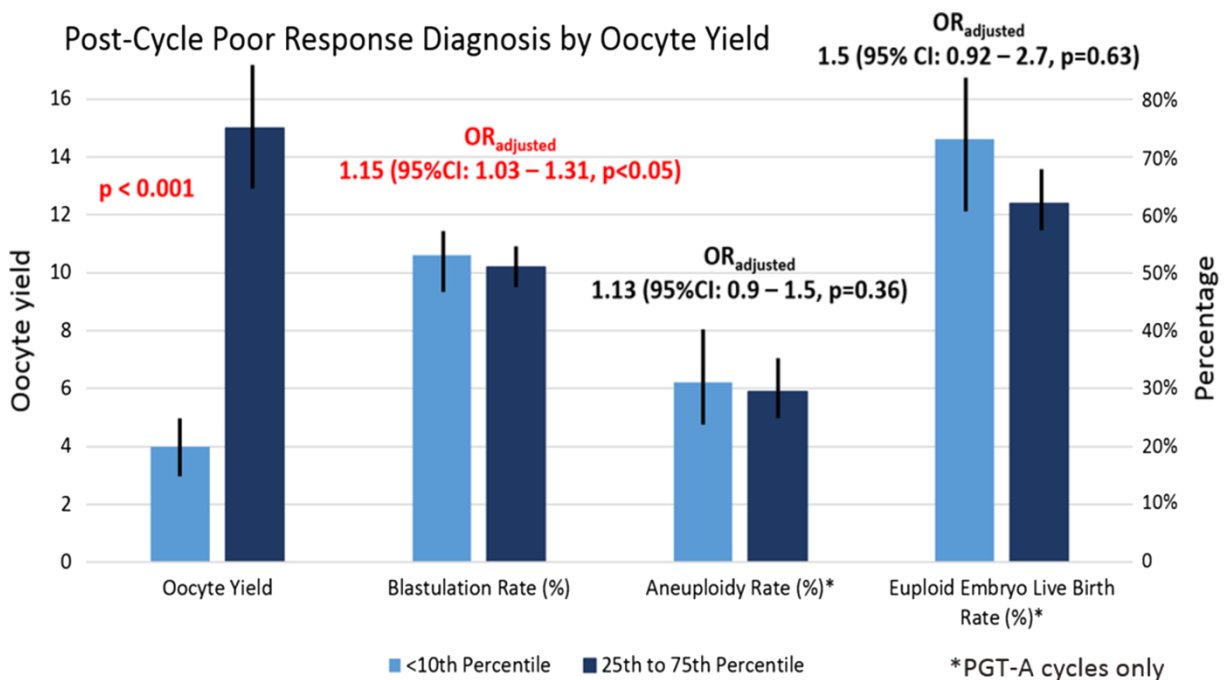


Figure 14. Diagnostic de la réponse ovarienne faible après le cycle FIV , par le rendement en ovocytes

Il n'existe aucune étude rapportée dans la littérature ayant permis de déterminer une corrélation entre une diminution de la réserve ovarienne et des signes de moindre qualité des ovocytes.

III.2 AMH et Syndrome des ovaires polykystiques

Le dosage de l'AMH est également intéressant dans le syndrome des ovaires polykystiques. Le SOPK est caractérisé par un hyperandrogénisme, une dysfonction ovulatoire et/ou des ovaires polykystiques (52). Le SOPK est une pathologie endocrinienne fréquente chez la femme; cependant, des variabilités cliniques interindividuelles considérables existent chez les patientes atteintes du SPOK. Le diagnostic du SOPK n'est pas basé sur un seul critère, mais sur une combinaison des données cliniques, biologiques et la présence des ovaires polykystiques morphologiques lors de l'échographie pelvienne.

Il sont proposées deux définitions plus récentes pour le diagnostic du SOPK (68). Une définition est basée sur les critères de Rotterdam (69) où deux des trois éléments suivants doivent être présents: hyperandrogénie clinique ou biologique, oligospamnioménorrhée, nombre de follicules en début de cycle (entre 2 et 9 mm) supérieur à 12 sur chaque ovaire ou volume ovarien supérieur à 10 cm³. Certains auteurs ont réajusté ce dernier critère devant l'amélioration des performances techniques des sondes d'échographie. Ils proposent de fixer ce seuil à 19 follicules antraux par ovaire (70), voire 25 (71). L'autre définition est proposée par l'Androgen Excess Society en 2006. Les critères de l'AES sont une hyperandrogénie clinique et/ou biologique, et, des symptômes cliniques d'un trouble de l'ovulation et/ou la présence des ovaires polykystiques morphologiques lors de l'échographie pelvienne (72). Ces deux définitions dépendent de l'utilisation d'une méthode fiable pour la caractérisation préalable des ovaires polykystiques morphologiques. Actuellement, le CFA est largement utilisé dans cette indication. Or, le CFA doit être effectué au début du cycle menstruel en raison de la variation intra-cycle; il n'est pas réalisable chez les patientes adolescentes ou très jeunes et, les performances de cet examen seraient diminuées chez les femmes obèses et en surpoids (61).

Dans ce contexte, le dosage de l'AMH pourrait être utilisé pour évaluer le critère concernant la présence d'une morphologie d'ovaires polykystiques pour le diagnostic du SOPK notamment lorsque le CFA n'est pas réalisable (52).

Une caractéristique du SOPK est une élévation des taux sériques de LH, même si cette élévation n'est pas constante et reste inexpliquée (73). Dans le SOPK il y a un défaut

de sélection du follicule dominant. Il en résulte une accumulation de petits follicules préantraux, lesquels sont la source principale de l'AMH. La sévérité du phénotype du SOPK chez la femme est corrélée à la production d'AMH. (74). Les études retrouvent en effet un taux d'AMH supérieur chez ces patientes par rapport aux femmes normo-ovulantes. L'augmentation du taux d'AMH, en cas de SOPK, serait responsable de l'arrêt de la croissance folliculaire, l'AMH inhibant l'action de la FSH au moment de la sélection folliculaire (65).

Récemment, Catteau-Jonard et *al.* ont montré dans une étude que l'AMH induit la sécrétion de LH en stimulant l'activité des neurones hypothalamiques à GnRH exprimant le récepteur de l'AMH *in vivo* dans les espèces murine et humaine. Ces données mettent en avant l'AMH comme régulateur important du système à GnRH, ouvrant de nouvelles pistes pour l'exploration du rôle de l'AMH dans la fonction reproductive (19).

Afin d'examiner les effets de l'AMH sur la sécrétion de la LH hypophysaire *in vivo*, Catteau-Jonard et *al.* ont administré directement de l'AMH dans le ventricule latéral du cerveau de souris femelles en diœstrus lorsque la sécrétion de GnRH était basale, et ont mesuré la sécrétion de LH, qui est un reflet de la sécrétion de GnRH. Les concentrations plasmatiques de LH ont été analysées 15 et 30 minutes après l'administration de doses croissantes d'AMH et une augmentation rapide de la sécrétion de LH a été observée 15 minutes après injection. Cette sécrétion revient à l'état de base 30 minutes après l'injection. L'administration d'inhibiteurs des récepteurs de type I de l'AMH atténue significativement cette sécrétion, indiquant qu'elle dépend d'un signal passant par les récepteurs de l'AMH. Des prélèvements de sang répétés ont par ailleurs montré que le traitement à l'AMH entraînait une augmentation de la fréquence de la sécrétion pulsatile de LH chez la souris. Les effets de l'AMH sur la sécrétion de LH ont été complètement bloqués par un traitement des souris par le cetrorelix (antagoniste du récepteur de la GnRH qui sature les sites anté-hypophysaires), ce qui exclut un effet direct de l'AMH au niveau hypophysaire et confirme une action centrale de l'AMH sur les neurones à GnRH (19). Cette augmentation de la pulsativité de la LH est une caractéristique pathologique retrouvée dans de nombreux cas de SOPK (**Figure 15**). Jusque-là, l'augmentation de la fréquence des pics de LH dans le SOPK était attribuée à un défaut de rétroaction négative exercé par la progestérone, du fait d'une « androgénisation hypothalamique » dès la vie fœtale (75).

Ces résultats montrent de manière inédite que la sécrétion de GnRH hypothalamique est régulée par l'AMH et que cette régulation pourrait être impliquée dans la physiopathologie de la fertilité, ouvrant ainsi de nouvelles pistes de traitement du syndrome des ovaires polykystiques (19).

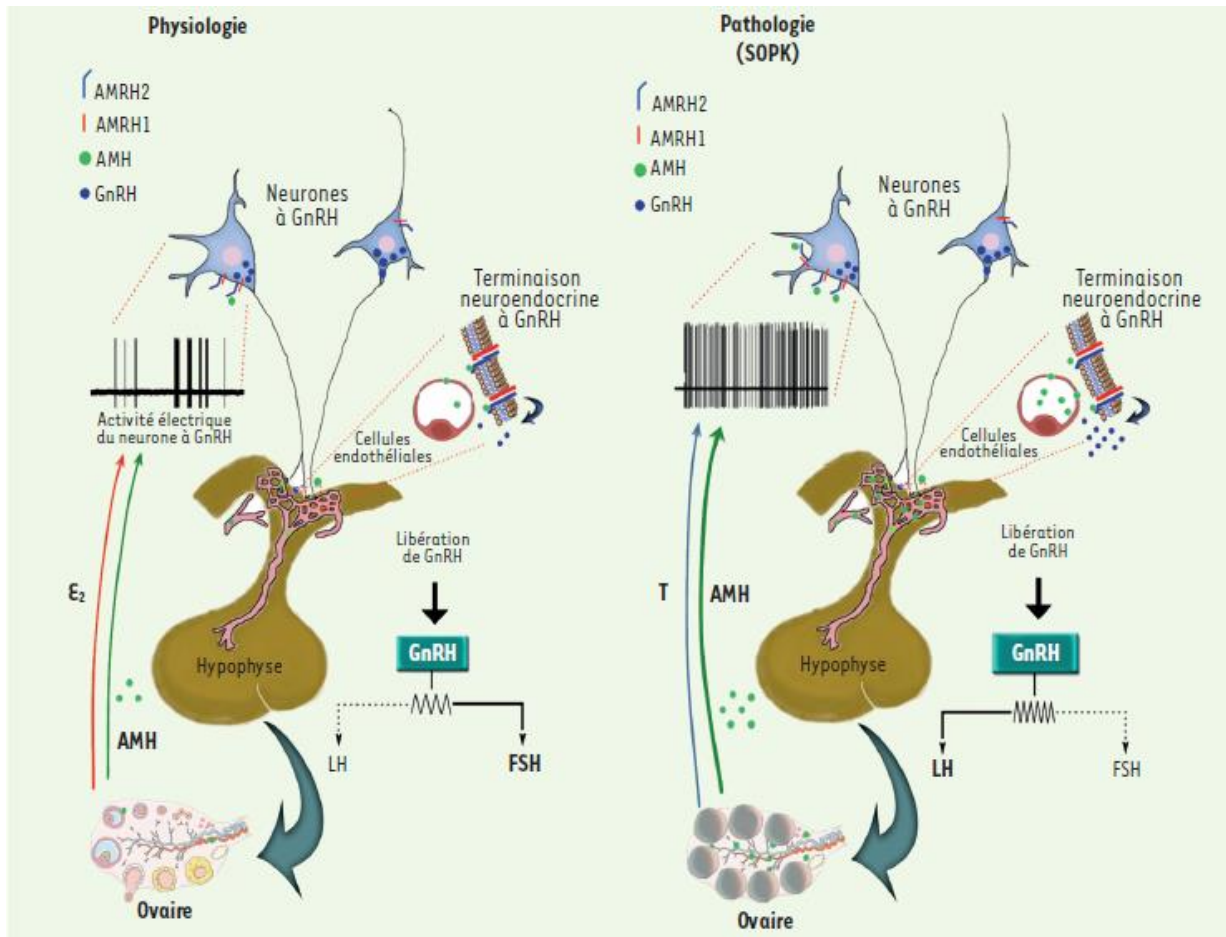


Figure 15. Mécanisme d'action de l'AMH sur les neurones à GnRH (19)

III.2.1 AMH comme facteur prédictif d'une naissance prématurée dans un contexte de SOPK

La naissance prématurée, définie comme un accouchement avant 37 semaines, touche environ 10% des grossesses aux États-Unis et constitue la principale cause de décès et d'invalidité chez les nourrissons dans les pays développés (76). Chez les patientes atteintes du SOPK, les anomalies de la parturition sont courantes et ont de graves conséquences médicales et économiques. Des marqueurs prédictifs de résultats obstétricaux indésirables pour la stratification du risque de la patiente sont nécessaires. (77).

Hsu JY *et al.* a étudié l'impact des niveaux d'AMH sur 432 grossesses. Il y avait deux causes responsables de l'arrêt du travail : la naissance prématurée et la naissance par césarienne (**Tableau 2**). Comme le niveau d'AMH est fortement biaisé par certains diagnostics d'infertilité, l'analyse de la prématurité a été stratifiée par le diagnostic du syndrome des ovaires polykystiques, et l'accouchement par césarienne pour l'analyse de l'arrêt du travail a été stratifié par le diagnostic de réserve ovarienne diminuée. Parmi les femmes atteintes du SOPK, celles qui avaient accouché prématurément avaient des taux d'AMH nettement plus élevés (18 vs 6,4 ng/mL, P = 0,003) que celles qui ont accouché au terme.

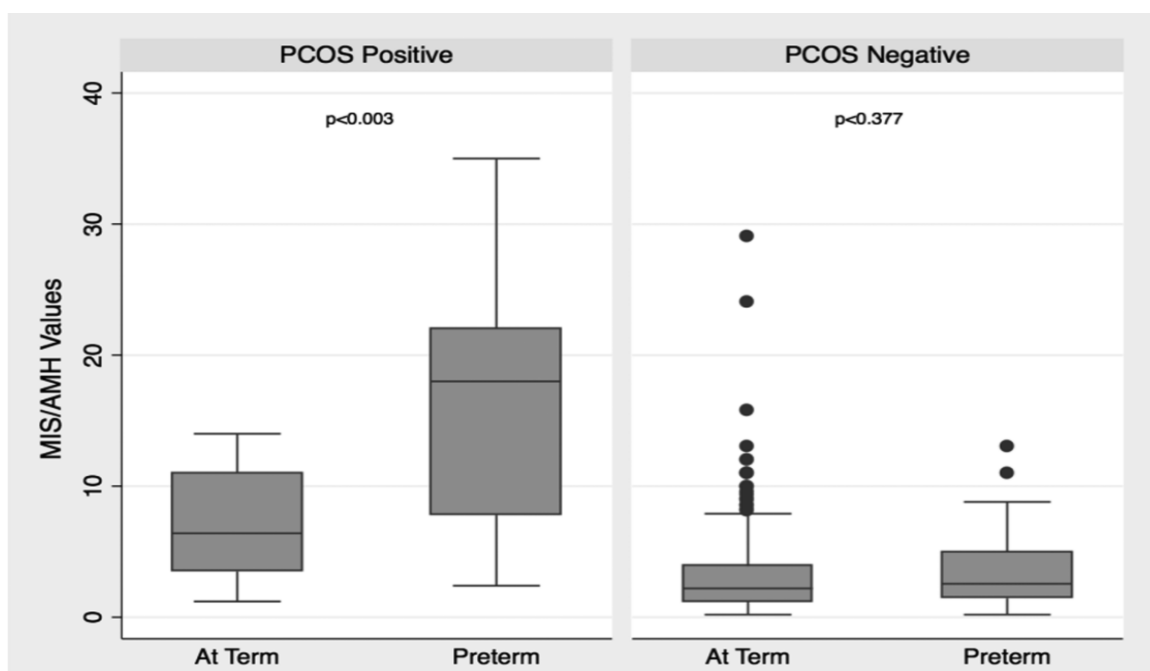
Tableau 2. Répartition d'AMH sur une cohorte de grossesses

	Toutes les naissances (n = 432)	Livraisons à terme (n = 392)	Livraisons avant terme (n = 40)
MIS / AMH, ng / mL			
Moyenne ± écart type	3,80 ± 4,22	3,44 ± 3,39	7,39 ± 8,15
Médiane, étendue	2,6 (0,2-35)	2,45 (0,2 à 29)	4,15 (0,2-35)
Distribution / valeur			
≥75 ^{ème} percentile / ≥4,75 ng / mL	-	90/392 (23%)	18/40 (45%)
≥90 percentile / ≥8.5 ng / mL	-	34/392 (8,7%)	11/40 (27,5%)

Les valeurs d'AMH les plus élevées ont été associées aux accouchements prématurés; chez les femmes atteintes du SOPK, pour des valeurs au-dessus du 90^{ème} percentile tous les accouchements étaient prématurés. Aucune relation entre le niveau d'AMH et la grossesse n'a été observé chez les femmes sans SOPK (**Tableau 3**) (77).

En conclusion, chez les femmes atteintes de SOPK, les taux d'AMH substantiellement élevés sont associés de manière significative à la naissance prématurée, ce qui suggère un suivi plus étroit et des études supplémentaires pour élucider les mécanismes sous-jacents (77).

Tableau 3. Répartition des niveaux d'AMH chez les femmes avec et sans SOPK en fonction du moment de l'accouchement



III.2.2 Les valeurs de l'AMH pendant la grossesse : SOPK et patientes contrôle

Köninger A. *et al* ont réalisé une étude observationnelle qui comprend une analyse transversale des valeurs d'AMH des 52 femmes atteintes du SOPK et des 51 témoins, déterminée à quatre moments différents (avant la grossesse, au premier trimestre, au deuxième trimestre et au troisième trimestre de la grossesse) (78).

Chez les femmes atteintes du SOPK (**Figure 16**) et chez des témoins en bonne santé (**Figure 17**), les taux d'AMH ont diminué de manière significative ($P < 0,05$) par rapport au niveau d'avant la grossesse au cours de chaque trimestre. Après ajustement sur l'âge maternel, l'âge gestationnel et l'IMC maternel, les taux d'AMH avant la grossesse étaient 2 fois plus élevés chez les femmes atteintes du SOPK que chez les témoins (médiane 7,66 versus 2,67 ng/mL). Au cours du premier trimestre, les niveaux d'AMH restent plus élevés chez les femmes atteintes de SOPK par rapport aux témoins (médiane 5,33 versus 2,48 ng/mL). Au deuxième et au troisième trimestre, les différences des taux d'AMH entre les femmes atteintes de SOPK et les témoins n'étaient pas statistiquement significatives (78).

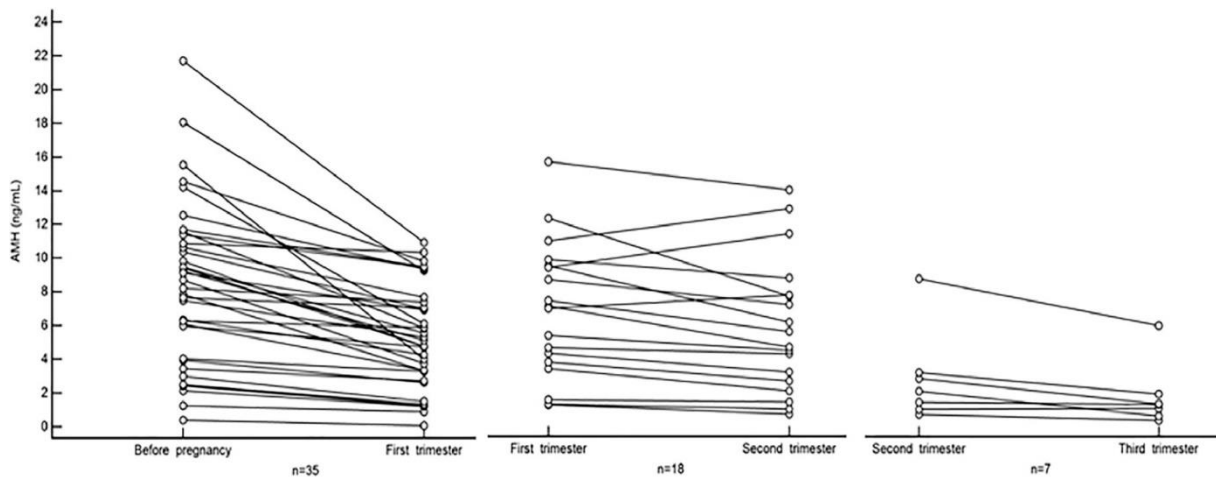


Figure 16. Détermination longitudinale des taux d'AMH chez les femmes atteintes du SOPK avant la grossesse et à chaque trimestre (78)

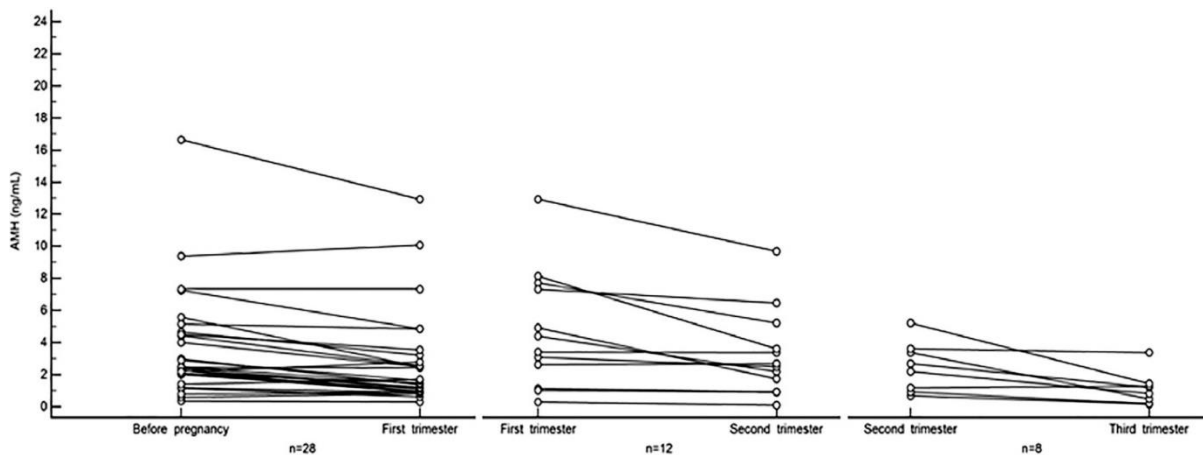


Figure 17. Détermination longitudinale des taux d'AMH chez les témoins avant la grossesse et à chaque trimestre (78)

En conclusion, les résultats confirment que la folliculogénèse est largement réprimée pendant la grossesse et que cette suppression entraîne des taux d'AMH similaires à la fin de la grossesse chez les femmes atteintes du SOPK et les témoins. L'affiliation par étapes des niveaux élevés d'AMH chez les femmes atteintes du SOPK aux niveaux des femmes sans SOPK démontre que la sécrétion d'AMH peut être inhibée dans le SOPK. Des études complémentaires sont recommandées pour identifier les facteurs qui inhibent la folliculogénèse, ce qui entraîne une diminution de la sécrétion d'AMH dans le SOPK *in vitro* et *in vivo* (78).

III.3 En pédiatrie: AMH et désordres du développement sexuel (DSD)

Aussi appelés développements sexuels différents, les désordres du développement sexuel (de l'anglais Disorders of Sex Development) sont le résultat de dysfonctionnements de l'organogenèse dans les premières semaines de vie embryonnaire. Le terme DSD regroupe toutes les situations dans lesquelles le développement du sexe chromosomique, gonadique ou anatomique est non concordant (79). Les termes ambiguïté sexuelle, réversion sexuelle, pseudohermaphrodisme et hermaphrodisme ne sont plus utilisés (52).

La fréquence des DSD est estimée à 1 sur 300 naissances. Les DSD sévères sont plus rares, avec une fréquence de 1 sur 4500 naissances. La question du choix du sexe ne se pose que pour environ 1 sur 5000 nouveau-nés. La stratégie actuelle de prise en charge des DSD réside sur l'obtention du diagnostic étiologique (79). L'examen clinique est primordial, notamment des organes génitaux externes (forme, taille, implantation, symétrie). Outre le caryotype et l'analyse du gène SRY, un bilan biologique comprenant le dosage de la FSH, de la LH, de la testostérone est réalisé. Ce bilan peut être complété par l'AMH, car elle reflète la fonction sertolienne du testicule (52). L'échographie pelvienne recherche des dérivés müllériens et les gonades; elle peut être complétée par d'autres examens d'imagerie et/ou une laparoscopie (80). Le choix du sexe du nourrisson dépendra de l'anatomie des organes génitaux externes et internes, des possibilités de réparation chirurgicale, du diagnostic étiologique et de ce qui est connu de l'évolution pubertaire de ces anomalies. Cependant, même si les techniques moléculaires ont progressé, aucun diagnostic étiologique n'a été trouvé chez la moitié des garçons nés avec un défaut de virilisation en 2016 (79).

Dans ce contexte, le dosage de l'AMH ferait partie du bilan biologique pour but d'évaluer la présence et la fonctionnalité du tissu testiculaire sertolien en remplacement du dosage de l'inhibine B (81).

La Société britannique d'endocrinologie a publié pour la première fois en 2011 une recommandation concernant l'évaluation initiale d'un enfant ou adolescent avec suspicion de DSD. La présente recommandation est une mise à jour réalisée en 2015 pour laquelle un groupe de travail a été constitué avec la participation des représentants de neuf sociétés savantes et de deux associations de soutien aux patients (82). L'analyse de cette recommandation avec la grille AGREE II a permis de conclure qu'il s'agit d'une recommandation de bonne qualité méthodologique d'élaboration (52).

Selon la Société britannique d'endocrinologie, le dosage de l'AMH est pertinent pour évaluer l'activité des cellules de Sertoli chez les enfants avec suspicion de DSD et peut également être d'utilité diagnostique dans des conditions associées à une déficience ou une insensibilité aux androgènes. De plus, la valeur discriminante de l'AMH dans les cas de cryptorchidie bilatérale est si élevée que des mesures indétectables confirment l'absence de tissu testiculaire et une exploration chirurgicale invasive n'est pas nécessaire.

En conclusion, le dosage de l'AMH fait partie du bilan biologique chez les enfants et les adolescents avec suspicion de DSD. Les valeurs de référence de l'AMH sont dépendantes de la technique de dosage utilisée (52).

IV.AMH et cancer

En 2019, le nombre de nouveaux diagnostics de cancer en France métropolitaine est estimé à 382 000 pour l'ensemble de la population, respectivement 204 600 hommes et 177 400 femmes. Chez les femmes, le cancer du sein est de loin le plus fréquent devant les cancers colorectaux et du poumon.

Les mécanismes de toxicité ovarienne de la chimiothérapie ne sont pas encore parfaitement connus. Plusieurs hypothèses ont été émises, la principale étant celle de l'atteinte directe des cellules de la granulosa des follicules et des cellules germinales qui conduirait à une apoptose. Des mécanismes vasculaires et une fibrose du tissu ovarien sont probablement également impliqués (83).

La radiothérapie abdominopelvienne et l'irradiation corporelle totale exposent les ovaires à une insuffisance ovarienne prématurée due à une déplétion du stock de follicules primordiaux. La gravité de la déplétion ovocytaire est proportionnelle à la réserve ovarienne pré-existante au traitement (52).

IV.1 Préservation de la fertilité féminine

Le champ de la préservation de la fertilité féminine comprend les pathologies susceptibles de faire indiquer un traitement potentiellement gonadotoxique dont le cancer, les pathologies génétiques et les pathologies dysimmunitaires et, où une insuffisance ovarienne prématurée (IOP) peut avoir lieu (84).

L'AMH peut être également utilisée en pratique clinique pour évaluer les dommages causés sur l'ovaire par des traitements gonadotoxiques comme l'irradiation pelvienne, la chirurgie ovarienne ou la chimiothérapie. Son dosage avant la réalisation de ces traitements peut aider le clinicien dans le choix de sa stratégie de préservation de la réserve ovarienne de la patiente. On peut donc penser qu'en préservation de fertilité, l'AMH puisse être un indicateur temporel sur le potentiel reproductif restant de ces jeunes femmes à distance d'une chimiothérapie (85).

Peigné *et al.* (86) ont étudié l'intérêt du dosage de l'AMH pour l'évaluation des effets adverses à court et long termes de la chimiothérapie sur la réserve ovarienne. Quinze études prospectives observationnelles ont été incluses. Toutes les études incluaient les valeurs du dosage de l'AMH pré- et post-traitement par chimiothérapie. Les patientes incluses dans les études originales étaient atteintes de différents types de cancer. Sept études incluaient des patientes atteintes d'un cancer du sein (n=270), deux études avec des patientes atteintes d'un lymphome (n=68) et une étude avec des patientes atteintes d'un cancer hématologique(n=25). Deux études incluant des patientes atteintes d'un cancer infantile (n=56) et trois études, chez les femmes adultes, incluaient des patientes atteintes de tout type de cancer (n=71).

Cette méta-analyse a montré que les valeurs du dosage de l'AMH post-traitement chez les femmes ayant reçu une chimiothérapie étaient toujours significativement inférieures à celles des témoins appariées sur l'âge. Les valeurs de l'AMH avant le traitement étaient comparables à celles des témoins appariées sur l'âge pour les patientes atteintes d'un cancer du sein; par contre, l'AMH était significativement diminué en comparaison aux témoins chez les femmes atteintes d'un cancer hématologique. Une chute rapide des niveaux sériques de l'AMH a été observée après le début de la chimiothérapie. Cette chute a été décrite dès la première semaine de chimiothérapie dans deux études, 15 jours après le début du traitement dans une étude, un mois et trois mois après le début de la chimiothérapie par deux autres études. À la fin de la chimiothérapie, toutes les études ont rapporté une diminution significative ou des valeurs indétectables d'AMH sérique indépendamment des protocoles mis en place. Au contraire, le profil de récupération ovarienne variait fortement selon le protocole mis en place. Les patientes traitées avec un protocole sans alkylants ou avec un traitement à risque gonado-toxique faible ou médian retrouvent un taux d'AMH équivalent à celui de pré-chimiothérapie dès le sixième mois de suivi après traitement, tandis que le taux d'AMH reste significativement plus bas, voire même indétectable chez les femmes ayant reçu des alkylants ou des traitements à haut risque gonadotoxique et ce même jusqu'à trois ans après la fin du traitement. Toutes les patientes en aménorrhée persistante après un an de suivi ont une AMH indétectable. Les valeurs du

dosage sérique de l'AMH prétraitement chez les femmes atteintes d'un cancer du sein ont une meilleure valeur prédictive de l'activité menstruelle après quatre à cinq ans de suivi que l'âge de la patiente (86).

Kim *et al.* ont mené une étude sur 82 femmes visant à évaluer l'intérêt des marqueurs biologiques en post-chimiothérapie sur une période de 5 ans, pour prédire le rétablissement de la fonction ovarienne chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, avec une aménorrhée induite par la chimiothérapie. Les taux sériques post-chimiothérapie de l'AMH, de l'œstradiol et d'autres facteurs cliniques associés à l'aménorrhée induite par la chimiothérapie ont été évalués. La récupération de la fonction ovarienne était définie par la reprise de la menstruation (87). Le retour des règles, les taux d'AMH, de FSH et d'œstradiol ont été évalués tous les 6 mois après chaque visite, et au moins une fois par an par la suite. L'âge, l'œstradiol et l'AMH étaient statistiquement significatifs dans la prédiction de la reprise de la menstruation (**Tableau 4**). La précision diagnostique de l'âge, de l'œstradiol et de l'AMH pour prédire la reprise de la menstruation était de 38,3%, 23,3% et 86,7%, respectivement.

En conclusion, le taux d'AMH après la chimiothérapie chez les patientes présentant une aménorrhée induite par la chimiothérapie pourrait constituer un marqueur prédictif précis du rétablissement de la fonction ovarienne (87).

Tableau 4. Exactitude diagnostique des mesures prédictives pour la reprise de la menstruation (n = 60)

Characteristics	Subgroups	Menstruation return for 5 years		P value	Diagnostic accuracy
		Yes	No		
Age (years)	<40	16	1	0.420	Sensitivity = 30.8% Specificity = 87.5% Positive predictive value = 94.1% Negative predictive value = 16.2% Diagnostic accuracy = 38.3%
	≥40	36	7		
Oestradiol (pg/mL)	≥37	6	0	0.585	Sensitivity = 11.5% Specificity = 100.0% Positive predictive value = 100.0% Negative predictive value = 14.8% Diagnostic accuracy = 23.3%
	<37	46	8		
Anti-Müllerian hormone (pg/mL)	≥800	48	4	0.008	Sensitivity = 92.3% Specificity = 50.0% Positive predictive value = 92.3% Negative predictive value = 50.0% Diagnostic accuracy = 86.7%
	<800	4	4		

Actuellement, la patiente est reçue en consultation, idéalement avant tout traitement anticancéreux, par le praticien dans le centre de médecine et de biologie de la reproduction. Cette consultation a pour but de compléter l'information sur les conséquences connues des traitements du cancer sur la fonction de reproduction et d'envisager les finalités et les modalités de la préservation de la fertilité (83). Le bilan réalisé lors de cette consultation prend en compte l'âge et la réserve ovarienne de la patiente. Le dosage de l'AMH sérique et le CFA seraient désormais systématiquement évalués lors de cette consultation, puis dans le cadre du suivi de la fonction ovarienne (84).

Le dosage de l'AMH pourrait potentiellement être recueilli en tant que paramètre objectif de la fonction ovarienne lors des suivis des patientes à long terme. Il permettrait ainsi d'apprécier la gonadotoxicité des traitements utilisés et de repérer les traitements les plus gonadotoxiques (52). De plus, le dosage de l'AMH en pré-et post-traitement serait un élément de décision pour la mise en place d'une stratégie de préservation de la fertilité (88) en complément du CFA ou en remplacement de celui-ci.

IV.2 Traitement du cancer chez l'enfant : effets à long terme sur les marqueurs de la réserve ovarienne

Le traitement du cancer de l'enfant peut compromettre la fonction ovarienne chez les femmes en rémission du cancer, entraînant un retard de puberté, une infertilité et une issue défavorable de la grossesse (89). De plus, le traitement peut induire une ménopause prématurée, car il peut épuiser le réservoir non renouvelable de follicules primordiaux dans l'ovaire (90).

Étant donné le caractère invasif des évaluations histologiques du tissu ovarien, l'évaluation de la réserve ovarienne s'appuie sur des marqueurs indirects et de substitution (91). Actuellement, AMH et CFA sont considérés comme les marqueurs les plus prometteurs (59).

Van den Berg *et al.* ont mené une étude de cohorte rétrospective sur la fertilité, la réserve ovarienne et la ménopause prématurée. La population était composée de femmes adultes survivantes à 5 ans d'un cancer infantile (SCI), diagnostiquées avant l'âge de 18 ans. Pour permettre des comparaisons avec une population non traitée contre le cancer, deux types de groupes témoins ont été utilisés: des sœurs des SCI participantes et des femmes de la population générale (témoins). Dans les deux groupes, les niveaux d'AMH, du CFA et d'inhibine B diminuaient avec l'âge, tandis que la FSH augmentait. Cependant, les SCI

avaient des valeurs d'AMH et de CFA plus basses que les témoins, les différences étant plus marquée après 35 ans, où il y avait une dégradation plus rapide des marqueurs de la réserve ovarienne. Cela indique qu'il faut conseiller à ces femmes de poursuivre leur grossesse plus tôt car leur durée de vie reproductive peut être plus courte que prévu. De plus, certains groupes de SCI présentent un risque élevé de diminution de la réserve ovarienne, quel que soit leur âge. Ces SCI doivent être correctement conseillées et les nouveaux patients recevant de tels traitements doivent être référés à un spécialiste de la reproduction pour des conseils en matière de préservation de la fertilité (92).

DEUXIEME PARTIE : Notre étude

I. But de l'étude

Vu son intérêt en clinique, l'hormone antimüllérienne est une analyse très prescrite par les médecins, surtout dans le service de PMA où l'évaluation de la réserve ovarienne est essentielle. Le CFA et le dosage d'AMH sont systématiquement évalués lors d'une consultation de préservation de la fertilité et dans le cadre du suivi de la fonction ovarienne (84).

A présent, au sein du laboratoire du CHU de Bordeaux, l'AMH fait partie des analyses envoyées à une structure traitante externe. Le traitement de l'analyse en dehors du centre hospitalier, fait que le rendu du résultat soit parfois long. Ce délai peut faire la différence pour la prise en charge d'une patiente atteinte de cancer, pour laquelle le résultat d'AMH est très contributif et décide le début d'une chimiothérapie.

C'est pourquoi, à la faveur de l'arrivée de l'automate Fujirébio, on s'est appuyé sur une étude de comparaison de techniques analytiques, en vue d'une internalisation du dosage d'AMH, afin de raccourcir le délai de rendu des résultats, parfois supérieurs à 10 jours.

Nous avons fait des dosages d'AMH en utilisant deux techniques différentes – Biomérieux (automate Vidas®) et Fujirébio (automate Lumipulse®), avec des kits mis à disposition par les fournisseurs. Les automates étaient déjà disponibles dans notre laboratoire avant de débiter l'étude. On s'en sert actuellement pour la réalisation d'autres dosages, notamment pour les analyses qui complètent les bilans virologiques, bactériologiques et hématologiques (Vidas®), ainsi que pour les biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer (Lumipulse®).

Néanmoins, le souci majeur du dosage d'AMH est l'absence de standard international disponible. Du fait de calibrations différentes, les résultats obtenus par les différentes techniques de dosage ne sont pas identiques. Les valeurs seuil publiées dans la littérature jusqu'à ce jour sont donc technique-spécifique. C'est pourquoi nous avons comparé les résultats obtenus par ces deux techniques, avec ceux obtenus par technique Roche dite de référence, en utilisant l'automate Cobas® (93).

Ceci est une étude observationnelle analytique que nous avons réalisée pendant mon stage d'hormonologie au CHU de Bordeaux qui a eu lieu entre mai et octobre 2019.

II. Matériel et Méthodes

II.1 Echantillons

Nous avons analysé les résultats d'AMH des 50 femmes âgées de 20 à 49 ans (médiane 27,5 ans) qui se sont fait prélever au sein de CHU. Pour cela, on a collaboré avec les médecins du service de PMA du CHU de Bordeaux afin qu'il demande sur le bon de prescription, le prélèvement d'un tube supplémentaire à chaque demande d'AMH, pour nous servir à faire des dosages sériques en parallèle sur Vidas® et Lumipulse®. Pendant une période de 3 semaines, on a collecté seulement 10 échantillons qui provenaient du centre de prélèvement, malgré un nombre beaucoup plus élevé des prescriptions d'AMH. Ceci est dû d'une part aux inadvertances au moment du prélèvement des patientes et d'une autre part au circuit des tubes et de leur manipulation par des personnes différentes.

Etant difficile de collecter en temps réel les prélèvements réalisés au CHU, nous avons proposé aux jeunes femmes qui travaillent au sein de notre laboratoire de participer à la présente étude. Nous avons eu au final, une cohorte de 40 volontaires qui ont donné leur accord pour se faire prélever. Il s'agit donc des femmes avec un statut médical qu'on ne connaît pas. Les 10 autres échantillons proviennent des prescriptions médicales du service de PMA du CHU de Bordeaux.

Les 50 prélèvements ont été réalisés sur tube sec gélosé qui ont été centrifugés à une température de +5°C, à 6000 tours, pendant 10 minutes. Après centrifugation, sur chaque prélèvement nous avons fait 3 aliquotes de sérum stockés à -20 jusqu'au moment de dosage.

Grâce au fait qu'on a eu à notre disposition les automates Vidas® et Lumipulse®, j'ai pu réaliser les 50 dosages au CHU. En ce qui concerne l'automate Cobas® (Roche), on a réussi à obtenir l'accord pour effectuer les tests dans un laboratoire privé. Grâce à l'amabilité de l'équipe du laboratoire Exalab de Haillan, ainsi qu'au fournisseur, nous avons eu à notre disposition tous les matériels dont on a eu besoin (réactifs, étiquettes à coller sur chaque

prélèvement, etc.). Je me suis chargée de transporter moi-même les tubes congelés, dans une boîte de transport à température ambiante afin que le sérum arrive décongelé au laboratoire. Les 40 prélèvements ont été ensuite centrifugés à nouveau à Exalab et passés sur le Cobas® avec l'aide d'un représentant Roche. Les 10 autres prélèvements qui provenaient des prescriptions médicales ont été analysés dans une structure traitante externe ou nous envoyons habituellement les demandes d'AMH, dosé également sur un automate Cobas®. Nous avons rassemblé ensuite les résultats obtenus.

II.2 Stabilité des prélèvements

Le stockage des échantillons a respecté les recommandations des fiches techniques des fournisseurs, relatives à la stabilité de l'AMH dans le sang centrifugé, respectivement 3 jours à 20-25°C, 5 jours à + 4°C et 6 mois à -20°C.

II.3 Automates

Sur chaque échantillon on a réalisé trois tests sur trois machines différentes. Un seul passage a été réalisé par automate et par tube.

Les automates utilisés dans le cadre de la présente étude sont l'appareil Cobas e 601® commercialisé par la société Roche, l'automate Vidas® mis à disposition par Biomérieux et l'appareil Lumipulse G600II® commercialisé par la société Fujirébio.

II.3.1 Cobas e 601®

II.3.1.1 *Caractéristiques*

Le module Cobas e 601® fait partie des séries du système Cobas Roche 6000 et c'est un analyseur entièrement automatisé qui repose sur la technologie brevetée de l'électrochimiluminescence (ECL) pour la réalisation d'analyses immunologiques. Il a été développé pour les déterminations, tant sur le plan quantitatif que qualitatif, de tests in vitro pour une large gamme d'applications (y compris anémie, marqueurs osseux, cardiaques et tumoraux, soins intensifs, fertilité/hormones, suivi de la grossesse et maladies infectieuses).

C'est un automate robuste qui offre des solutions personnalisées aux laboratoires de moyen à grand volume. Il a une grande sensibilité, fiabilité et reproductibilité des résultats grâce à la technologie ECL. Avec une détection automatique de l'intégrité des échantillons et une capacité de 20 portoirs de tubes, jusqu'à 25 tests peuvent être exécutés à un débit allant jusqu'à 170 tests / h. Le pipetage des échantillons se fait sans transfert afin d'éviter des

contaminations croisées. L'automate est lié à un ordinateur grâce auquel le manipulateur peut gérer entre autres, le fonctionnement des maintenances du système.



Figure 18. Cobas e 601®, Roche

II.3.1.2 Kit Elecsys® AMH

Le test immunologique Elecsys® AMH proposé par Roche est un test de laboratoire automatisé qui sert à évaluer la réserve ovarienne en combinaison avec d'autres résultats cliniques, échographiques et biologiques. Le test immunologique Elecsys® AMH, représente le premier test standardisé, automatisé et approuvé par l'agence américaine des produits médicamenteux (FDA) (93). Ce test par électrochimiluminescence s'utilise sur les analyseurs Elecsys® et Cobas e®.

La méthode a été standardisée par rapport au kit AMH Gen II ELISA (version non modifiée sans prédilution), technique de dosage de deuxième génération développée par Beckman Coulter®, apparu en 2005 sous le nom de kit AMH Gen II, et modifié en 2013. La nouveauté de ce kit modifié était basée sur le mélange préliminaire du calibrateur, du contrôle ou du sérum et du tampon échantillon sur la plaque ELISA au lieu d'une étape séquentielle comme dans le kit original.

II.3.1.3 Echantillon

Le dosage est possible sur sérum et plasma avec héparinate de lithium. Le volume total d'échantillon nécessaire par dosage est de 50 µL.

II.3.1.4 Principe du test

Le test d'AMH est un immunodosage utilisant deux anticorps spécifiques de l'AMH dans un format sandwich pour mesurer l'hormone dans le sérum ou dans le plasma avec de l'héparinate de lithium.

Le dosage consiste en deux incubations. Premièrement, 50 µL d'échantillon sont incubés avec un anticorps monoclonal anti-AMH biotinylé et un second anticorps anti-AMH monoclonal ruthényle formant un complexe lorsque l'AMH est présent dans l'échantillon. Deuxièmement, après addition de microparticules enrobées de streptavidine, le complexe se lie à la phase solide via l'interaction de la biotine et de la streptavidine. Le mélange réactionnel est aspiré dans la cellule de mesure où les microparticules sont magnétiquement capturées sur la surface de l'électrode. Les substances non liées sont ensuite supprimées avec la solution de déclenchement ProCell. L'application d'une tension à l'électrode induit alors une émission chimiluminescente qui est mesurée par un photomultiplicateur.

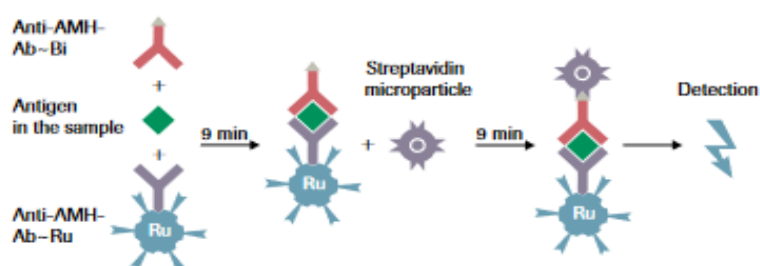


Figure 19. Principe du dosage d'AMH sur Cobas®

II.3.1.5 Performances analytiques

Le test est standardisé et couvre un domaine large de mesure de 0,01 à 23 ng/mL, avec une haute sensibilité fonctionnelle (CV < 20% / 0.03 ng/mL). Les dosages ont un coefficient de variation <1,8%, ainsi que des limites de détection et de quantification très basse (**Tableau 5**) qui viennent à la rencontre des besoins diagnostiques. Le kit contient deux points de calibrage et du réactif liquide prêt à l'emploi, stable 8 semaine sur l'analyseur.

Avec un faible volume d'échantillon utilisé pour le dosage du test, le résultat quantitatif est disponible après environ 18 min.

Tableau 5. AMH sur Cobas®. Aperçu des performances analytiques

	AMH ELECSYS®
Résultat	18 minutes
Echantillon	Sérum ou Plasma (Héparinate de lithium)
Volume	50 µL
Limite de quantification	0,03 ng/mL
Limite de détection	0,01 ng/mL
La plage de mesure	0,01 ng/mL à 23 ng/mL
Sensibilité fonctionnelle	0,03 ng/mL.
Effet crochet	Pas observé <1400 ng/mL d'AMH

Limites de la procédure

Une interférence peut être rencontrée avec certains sérums contenant des anticorps dirigés contre des composants du réactif, c'est pourquoi les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte du contexte clinique et éventuellement des résultats d'autres tests.

II.3.2 Lumipulse G600II®

II.3.2.1 Caractéristiques

Le Lumipulse G600II® est le dernier membre de la série LUMIPULSE G, les analyseurs CLEIA (immuno-analyse par chimioluminescence) de la marque japonaise Fujirébio, offrant une technologie entièrement automatisée. Il s'agit d'un analyseur de paillasse compact et robuste offrant un débit constant de 60 tests par heure. Le système utilise un concept unique de cartouche de test mono et offre une flexibilité et une manipulation facile, disponible actuellement en Europe et en Asie.

L'automate dispose d'une interface à écran tactile qui propose un menu à partir duquel on peut sélectionner le test ou l'action souhaités. Il dispose également d'une douchette grâce à laquelle on scanne les étiquettes des 33 échantillons (dont les contrôles) qu'on peut charger en même temps au bord de l'automate. Il utilise des cônes en plastique jetables, qu'il faut charger dans le bac correspondant, afin d'éviter les contaminations croisées. Il utilise une méthode de réaction en deux étapes, avec un temps total d'analyse de l'échantillon de 35 minutes (1 autre minute s'ajoute par test supplémentaire). Les résultats

peuvent être imprimés à partir de l'automate, grâce à l'imprimante intégrée à côté de l'écran tactile.



Figure 20. Lumipulse G 600II ®,Fujirébio

II.3.2.2 Kit d'AMH Lumipulse® G

L'automate propose plusieurs panels de tests parmi lesquels, celui de la fertilité qui intègre le dosage d'AMH.

Le kit Fujirébio pour la réalisation du dosage d'AMH contient les cartouches (3 x 14 tests) ainsi que les calibrateurs Lumipulse® G (1 x 3 niveaux x 1,5 mL), marqués CE, la preuve qu'ils respectent les exigences réglementaires en vue de la libre circulation sur l'ensemble du territoire de l'Union européenne.

La compagnie propose deux solutions en ce qui concerne les contrôles d'AMH, qui sont à commander séparément, car non fourni dans le kit. Il s'agit du produit AMH Contrôle qui propose 3 niveaux de contrôles (2 flacons de 2 mL pour chaque niveau) et le Seronorm™ Immunoassay Lyo 1 et 2 qui est un contrôle multimarquer (12 flacons x 3 mL pour chaque niveau).

Pour cette étude on a utilisé le Seronorm™ Immunoassay Lyo 1 et 2, qui sont à reconstituer et qui ont une stabilité de 10 jours entre 2°C et 8°C, respectivement 1 mois à -20°C.

II.3.2.3 Echantillon

Le dosage est possible sur sérum et plasma. Le volume total d'échantillon nécessaire par dosage est supérieur à 160 μL pour les cuvettes d'échantillon et 310 μL pour les tubes d'échantillon.

II.3.2.4 Principe de la procédure

Pour doser l'AMH, le Lumipulse® utilise une méthode d'immunodosage en deux étapes (**Figure 21**).

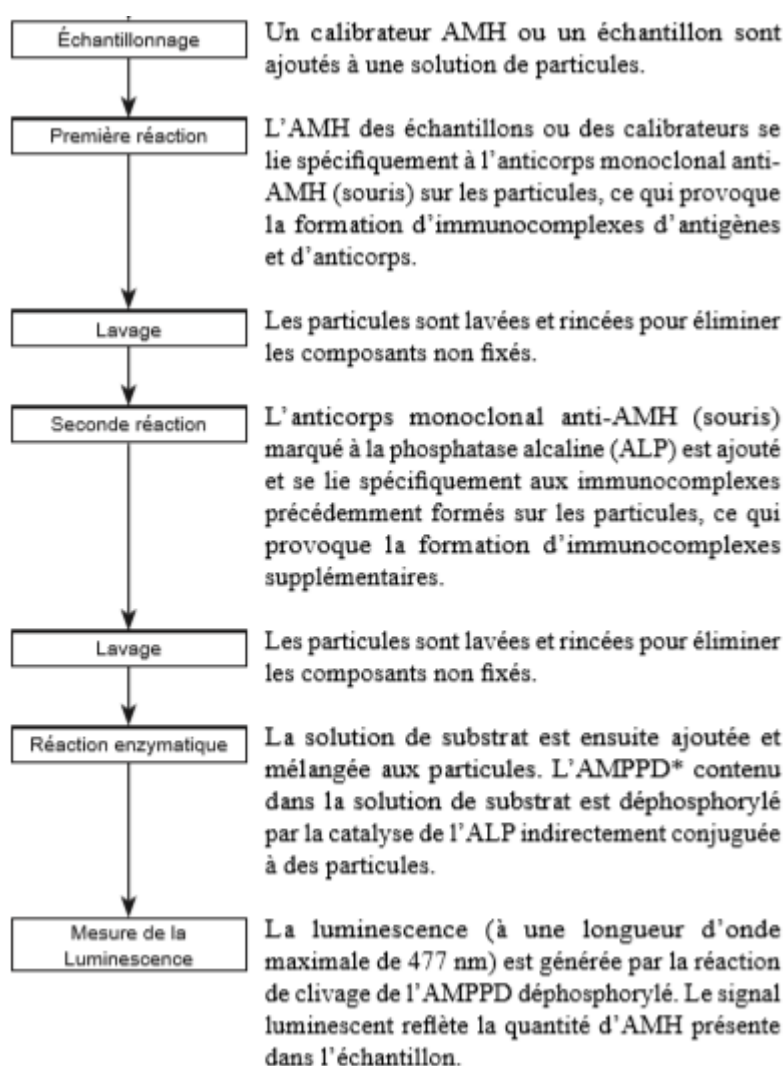


Figure 21. AMH – principe du dosage, Lumipulse®

II.3.2.5 Performances analytiques

Afin de se mettre en route, l'automate a besoin de moins de 10 minutes pour les configurations et les maintenances journalières. Pour la réalisation du test d'AMH, un étalonnage est à effectuer tous les 30 jours; trois points de calibrations sont nécessaires. L'automate utilise une seule cartouche d'immunoréaction par test, ce qui élimine le problème de stabilité des réactifs.

Les dosages ont un coefficient de variation <2,1%, ainsi que des limites de détection et de quantification très basse (**Tableau 6**).

Lorsque la concentration d'AMH de l'échantillon dépasse la plage de mesure, il y a lieu de diluer l'échantillon au 1:10 manuellement ou par dilution automatique, puis de recommencer la mesure. La dilution manuelle ou automatique des échantillons dont la concentration est inférieure à 60 ng/mL n'est pas recommandée. Il a été confirmé qu'il n'y a aucune influence notable sur les résultats de dosage lorsque l'échantillon est dilué à un taux de dilution de 1:10.

Tableau 6. AMH sur Lumipulse G600II®. Aperçu des performances analytiques

	AMH LUMIPULSE G®
Résultat	35 minutes
Echantillon	Sérum ou Plasma (EDTA, Héparine de Li, Héparine sodique)
Volume	160 µL pour les cuvettes d'échantillon 310 µL pour les tubes d'échantillon.
Limite de quantification	0,024 ng/mL
Limite de détection	0,010 ng/mL
La plage de mesure	0,010 ng/mL à 25 ng/mL
Limite supérieure de quantification	60 ng/mL
Calibrants	3/30 jours
Sensibilité LoB, LoD, LoQ	≤ 0,022 ng/mL.
Effet crochet	Pas observé <1000 ng/mL d'AMH
Tests/kit	42

Concernant la spécificité, le dosage Lumipulse G[®] AMH a été évalué pour la réactivité croisée du dosage avec d'autres substances similaires en structure à l'AMH (**Tableau 7**). La réactivité croisée du dosage de l'AMH a été déterminée par l'ajout d'hormones à des échantillons contenant de l'AMH. Le niveau d'AMH dans les échantillons a ensuite été déterminé.

Tableau 7. Spécificité d'AMH cf une étude sur Lumipulse G600II[®]

Réactif interférent	Concentration dosée	% de réactivité croisée
hFSH	500 mIU/mL	-0.344 à 0.059
hLH	500 mIU/mL	-0.515 à 0.328
Inhibine A	100 ng/mL	-0.252 à 0.013
Activine A	100 ng/mL	-0.486 à 0.005
TGF β -1	65 ng/mL	-0.228 à 0.049

Limites de la procédure

Une interférence peut être rencontrée avec certains sérums contenant des anticorps dirigés contre des composants du réactif, c'est pourquoi les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte du contexte clinique et éventuellement des résultats d'autres tests.

II.3.3 Vidas[®]

II.3.3.1 Caractéristiques

Automate d'immunoanalyses multiparamétrique, commercialisé par la société Biomérieux, Vidas[®] est un analyseur de laboratoire qui s'appuie sur la technologie éprouvée ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

Il s'agit d'un petit automate de paillasse, avec une unité analytique de 5 sections indépendantes de 6 compartiments, qui utilise des barrettes réactionnelles à test unique. Le principe VIDAS[®] consiste en l'interaction de deux éléments: le cône (phase solide) SPR[®] dont la surface interne est recouverte d'antigènes ou d'anticorps, et les barrettes, composées de plusieurs puits et contenant la quantité exacte de réactifs nécessaires pour le test (**Figure 22**). Les réactions se produisent dans le cône en deux étapes clés - réaction immunologique et réaction enzymatique.

Plusieurs tests peuvent être réalisés en même temps à condition qu'on utilise un compartiment différent de celui sur lequel il y a une demande en cours d'analyse. Il est piloté

par un PC indépendant (interface Windows), ayant une connexion bidirectionnelle au système d'information logistique (SIL). L'automate est prévu d'une douchette de code à barres qui permet l'enregistrement des échantillons dans le programme d'analyse.

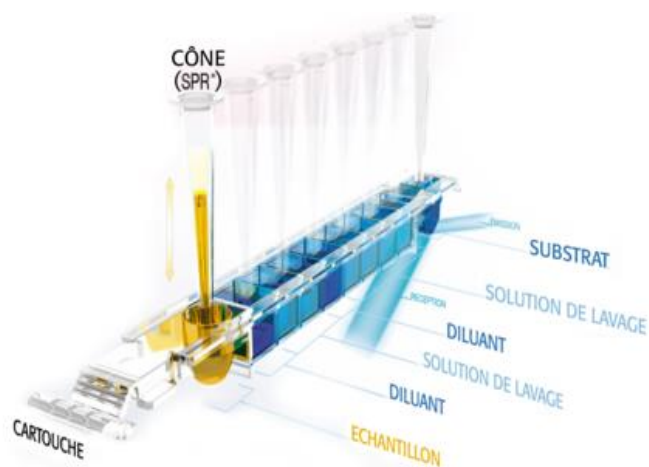


Figure 22. Principe du test unique Vidas®

L'automate offre un grand choix de paramètres (urgences, maladies infectieuses, immunochimie), ayant une cadence jusqu'à 90 tests/heure. C'est un automate simple d'utilisation et en revanche assez « manuel », car il sollicite le manipulateur dans toutes les étapes de traitement. Pour chaque test il y a besoin de programmer l'analyse, de pipeter un volume précis d'échantillon dans la cartouche et de l'insérer ensuite, avec les cônes, dans le compartiment et la position sur laquelle on a antérieurement programmé la demande sur le logiciel. La lecture des barrettes réactionnelles Vidas® est automatique.



Figure 23. Vidas®, Biomérieux

La société Biomérieux propose un panel « VIDAS® Fertilité » qui comprend 8 tests hormonaux automatisés, dont l'AMH.

II.3.3.2 Kit Vidas® AMH

Le kit Biomérieux pour la réalisation du dosage d'AMH contient 30 cartouches et cônes, le contrôle positif d'AMH (1 x 2 mL) ainsi que le calibrateur (2 x 2 mL) et le diluant (1 x 4,1 mL). Les valeurs attendues pour les passages du contrôle et du calibrant sont marquées dans la notice fournie dans le kit.

II.3.3.3 Principe de la procédure

Le principe du dosage d'AMH associe la méthode immunoenzymatique sandwich en une étape à une détection finale en fluorescence (ELFA). Les étapes réactionnelles sont réalisées automatiquement dans l'instrument. L'échantillon est prélevé puis transféré dans le puits contenant l'anticorps anti-müllérien marqué à la phosphatase alcaline (conjugué). Le mélange échantillon/conjugué est aspiré puis refoulé plusieurs fois par le cône. Cette opération permet à l'hormone anti-müllérienne de se lier d'une part aux immunoglobulines fixées sur le cône et d'autre part, au conjugué formant ainsi un sandwich. Des étapes de lavage éliminent les composants non fixés. Lors de l'étape finale de révélation, le substrat (4-Méthyl-ombelliferyl phosphate) est aspiré puis refoulé dans le cône ; l'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse de ce substrat en un produit (4-Méthyl-ombelliférol) dont la fluorescence émise est mesurée à 450 nm. La valeur du signal de fluorescence est proportionnelle à la concentration présente dans l'échantillon.

II.3.3.4 Echantillon

Le dosage est possible sur sérum et plasma, le volume nécessaire étant de 200 µL par test.

II.3.3.5 Performances analytiques

Le test couvre un domaine de mesure de 0,02 ng/mL à 9 ng/mL. Les échantillons avec des concentrations supérieures à 9 ng/mL doivent être retestés de préférence après dilution 1/4 dans le diluant fourni dans le kit. Des dilutions 1/10 et 1/20 sont également possibles. Les antécédents cliniques du patient doivent être pris en compte pour déterminer le facteur de dilution.

Avec une haute sensibilité fonctionnelle (CV < 20% / 0,02 ng/mL), les dosages ont un coefficient de variation ≈4,4%, ainsi que des limites de détection et de quantification très basses (**Tableau 8**).

Avec un volume d'échantillon de 200 µL utilisé pour le dosage du test, le résultat quantitatif est disponible après environ 35 min.

Tableau 8. AMH sur Vidas®. Aperçu des performances analytiques

	AMH VIDAS®
Résultat	35 minutes
Echantillon	Sérum ou Plasma (Héparine de Lithium)
Volume	200 µL
Limite de quantification	0,02 ng/mL
Limite de détection	0,01 ng/mL
La plage de mesure	0,02 ng/mL à 9 ng/mL
Étalonnage	28 jours
Sensibilité	≤ 0,02 ng/mL
Effet crochet	Pas observé <1600 ng/mL d'AMH
Tests/kit	30

Concernant la spécificité, le dosage Vidas® AMH a été évalué pour la réactivité croisée du dosage avec d'autres substances similaires en structure à l'AMH (**Tableau 9**). La réactivité croisée du dosage de l'AMH a été déterminée par l'ajout d'hormones à des échantillons contenant de l'AMH. Le niveau d'AMH dans les échantillons a ensuite été déterminé.

Tableau 9. Spécificité d'AMH d'après une étude sur Vidas®

Tested compound	Tested concentration	Cross-reactivity %
Activin A	100 ng/mL	≤ 0.10%
Inhibin A	100 ng/mL	≤ 0.12%
LH	500 IU/L	≤ 0.21%
FSH	500 IU/L	≤ 0.23%

Limites de la procédure

Une interférence peut être rencontrée avec certains sérums contenant des anticorps dirigés contre des composants du réactif, c'est pourquoi les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte du contexte clinique et éventuellement des résultats d'autres tests.

III. Résultats

Avec 50 échantillons, nous avons réalisé un dosage sur chacun des trois automates pour évaluer leurs concordances.

La série d'échantillons a été encadrée, pour chaque automate, par un passage de deux niveaux de contrôles (haut et bas) qui ont été conformes par rapport aux bornes attendues, grâce auxquels on a pu valider nos séries des résultats (**Tableau 10**).

Tableau 10. Résultats d'AMH obtenus sur chaque automate

	Age (ans)	AMH Cobas® ng/mL	AMH Vidas® ng/mL	AMH Lumipulse® ng/mL
Patiente 1	26	0,48	0,79	0,54
Patiente 2	39	3,53	3,85	3,73
Patiente 3	25	1,68	2,88	2,65
Patiente 4	21	1,21	3,51	1,79
Patiente 5	20	<0,03	<0.01	0,05
Patiente 6	27	2,93	6,14	4,24
Patiente 7	36	3,98	4,8	4,44
Patiente 8	30	2,55	4,09	4,52
Patiente 9	29	1,38	2,84	2,61
Patiente 10	32	0,38	0,37	0,39
Patiente 11	25	2,32	2,53	2,67
Patiente 12	23	2,60	3,57	3,08
Patiente 13	32	0,25	0,27	0,28
Patiente 14	28	3,53	4,05	3,99
Patiente 15	36	2,60	3,27	2,90
Patiente 16	27	3,55	3,16	3,86
Patiente 17	24	1,82	2,61	2,41
Patiente 18	25	2,62	2,66	2,79
Patiente 19	30	3,63	3,97	3,85
Patiente 20	20	2,62	2,62	2,89

Patiente 21	31	3,15	4	3,69
Patiente 22	25	6,87	8,03	6,97
Patiente 23	25	3,32	4,18	4,27
Patiente 24	28	5,00	5,06	6,38
Patiente 25	24	1,46	1,77	1,75
Patiente 26	33	3,75	3,13	3,72
Patiente 27	49	<0,01	<0,01	<0,01
Patiente 28	32	2,86	2,58	2,92
Patiente 29	25	2,40	2,36	2,93
Patiente 30	29	3,43	3,32	3,22
Patiente 31	20	9,57	11,79	12,42
Patiente 32	24	6,84	8,01	7,85
Patiente 33	32	1,46	1,85	1,96
Patiente 34	23	5,28	5,07	5,86
Patiente 35	31	2,01	1,91	2,31
Patiente 36	25	5,27	6,04	6,09
Patiente 37	24	2,00	2,14	1,98
Patiente 38	35	0,68	0,61	0,72
Patiente 39	26	6,43	7,23	7,00
Patiente 40	28	4,79	4,74	5,28
Patiente 41	29	0,31	0,61	0,61
Patiente 42	27	2,29	2,54	2,57
Patiente 43	34	3,33	3,65	3,55
Patiente 44	33	1,27	1,75	1,93
Patiente 45	39	0,34	0,39	0,41
Patiente 46	22	9,15	9,58	9,78
Patiente 47	25	2,59	2,88	2,68
Patiente 48	24	5,14	5,45	5,49
Patiente 49	24	0,59	0,73	0,78
Patiente 50	29	2,70	3,95	3,85

Avec une obtention plutôt homogène des valeurs, les résultats de chaque technique montrent conformément aux valeurs de référence des fournisseurs (détaillées dans la partie « valeurs de référence »), qu'il s'agit des patientes majoritairement jeunes (âge moyen de 27,5 ans) avec des taux d'AMH adaptés pour l'âge et variables en même temps en fonction de leur statut médical.

Les valeurs inférieures à la limites de quantification (<0,03 ng/mL) et de détection (<0,01 ng/mL) correspondent pour la patiente 5 à une anomalie de développement génital 46XY, respectivement à un âge auquel la sécrétion d'AMH est très basse, voir indétectable (patiente 27).

Les valeurs hautes (> 9,00 ng/mL) qui s'écartent du reste des résultats, correspondent à des jeunes femmes ayant un syndrome des ovaires polykystiques (Patiente 31 et Patiente 46). Pour ces échantillons, une dilution manuelle au 1/4^{ème} a été réalisée en technique Biomérieux, conformément aux recommandations du fournisseur.

L'obtention des valeurs proches des limites de la plage de mesure des automates, nous a permis de s'affranchir des performances analytiques pour les valeurs basses et hautes de chaque analyseur.

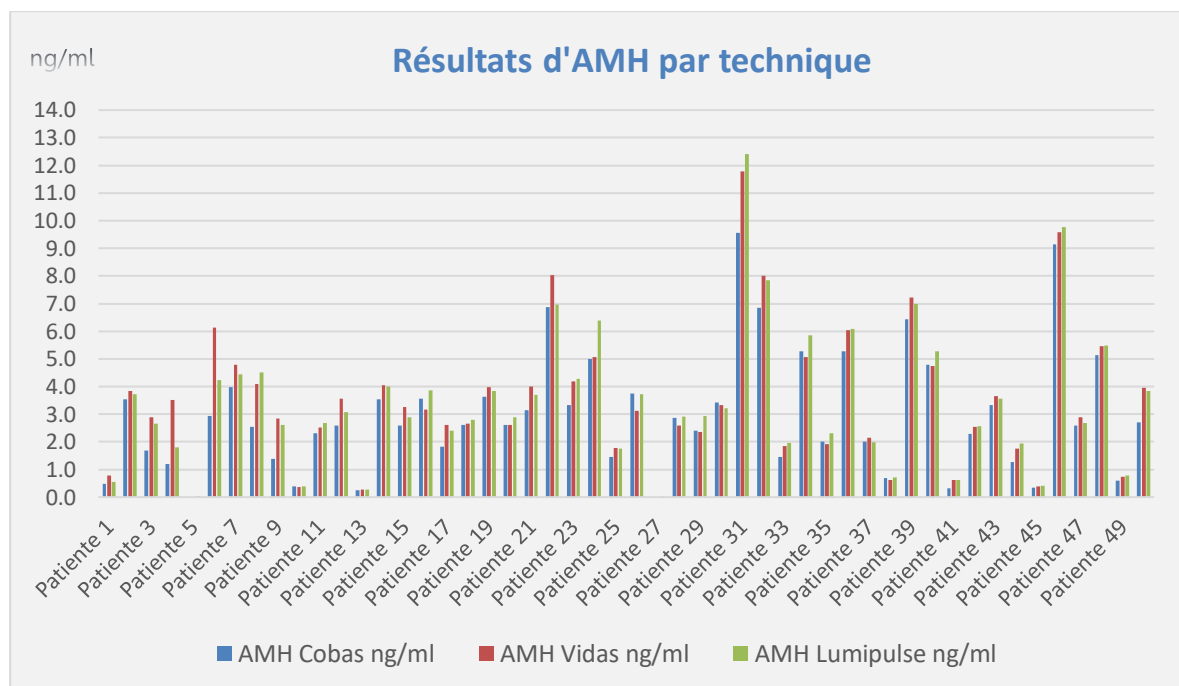


Figure 24. Résultats d'AMH par patient et par technique

Sur la dispersion des valeurs d'AMH par patient et par technique on observe, au premier regard, qu'il existe pour la majorité des échantillons une tendance à obtenir des résultats légèrement plus hauts par technique Biomérieux (Vidas®) et Fujirébio (Lumipulse®), par rapport à la technique Roche.

Pour s'apercevoir des variations et des concordances on va détailler les différences des résultats par technique utilisée et par rapport à la technique de référence, dans la partie «comparaison de méthodes».

III.1 Comparaison de méthodes

Lors de cette étude, nous avons comparé les valeurs des 50 échantillons obtenues par Cobas e 601® à celles obtenues avec les automates Lumipulse® et Vidas® en réalisant des tableaux de différences, des diagrammes de Bland-Altman et des courbes de linéarité, pour lesquelles on a utilisé la régression simple classique de Passing et Bablok.

Diagramme de Bland-Altman

Un diagramme de Bland-Altman permet de comparer les moyennes des mesures à leurs différences. La moyenne des différences « mean » indique si un des instruments tend à produire des valeurs systématiquement plus basses ou plus élevées que l'autre.

Graphique de linéarité

Le graphique linéaire permet d'obtenir la corrélation théorique entre deux variables aléatoires. Pour cela, on va calculer le coefficient de corrélation (R) qui nous permet de déterminer l'intensité d'un lien linéaire entre deux variables quantitatives à échelle d'intervalle ou de rapport. Pour que le lien linéaire entre les deux variables (x et y) soit fort, le coefficient de corrélation doit être le plus proche de -1 (lien linéaire négatif) ou de 1 (lien linéaire positif).

III.1.1 Cobas® versus Vidas®

III.1.1.1 Courbe de régression linéaire

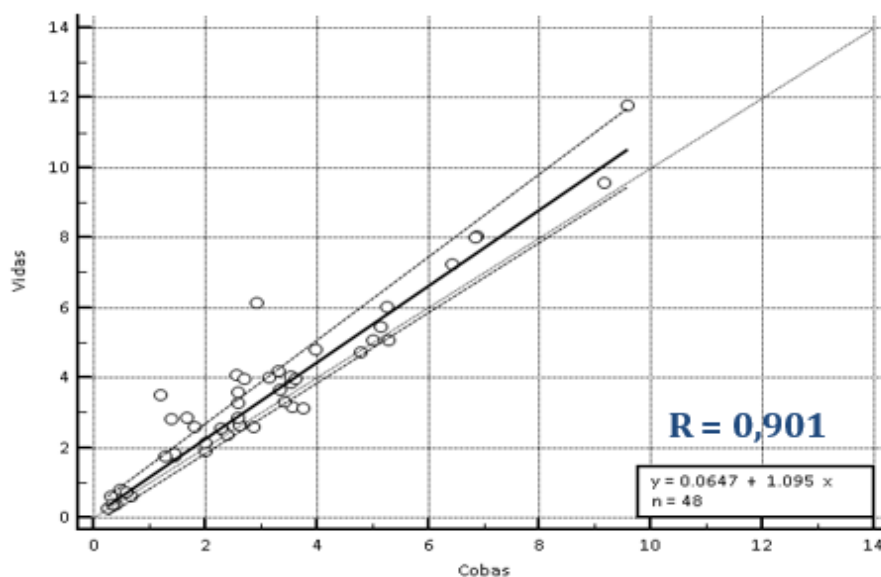


Figure 25. Droite de régression linéaire des résultats Cobas® vs Vidas®

La corrélation entre les résultats du Cobas® et ceux du Vidas® a été déterminée par la droite de régression linéaire de Passing et Bablok (**Figure 25**). Les valeurs négatives non interprétables (n=2) ont été exclues du calcul.

Tous les échantillons testés (n=48) se situent dans la plage dynamique de quantification des deux dosages: plage linéaire de 0,25 ng/mL à 9,57 ng/mL pour Cobas® et de 0,27 ng/mL à 11,79 ng/mL pour Vidas®. Comme vu sur la droite de régression linéaire, il y a une corrélation positive et significative ($R = 0,901$) entre les niveaux d'AMH obtenus pour les mêmes échantillons avec les deux tests.

Conclusion : la courbe de régression linéaire est conforme

III.1.1.2 Diagramme de Bland-Altman

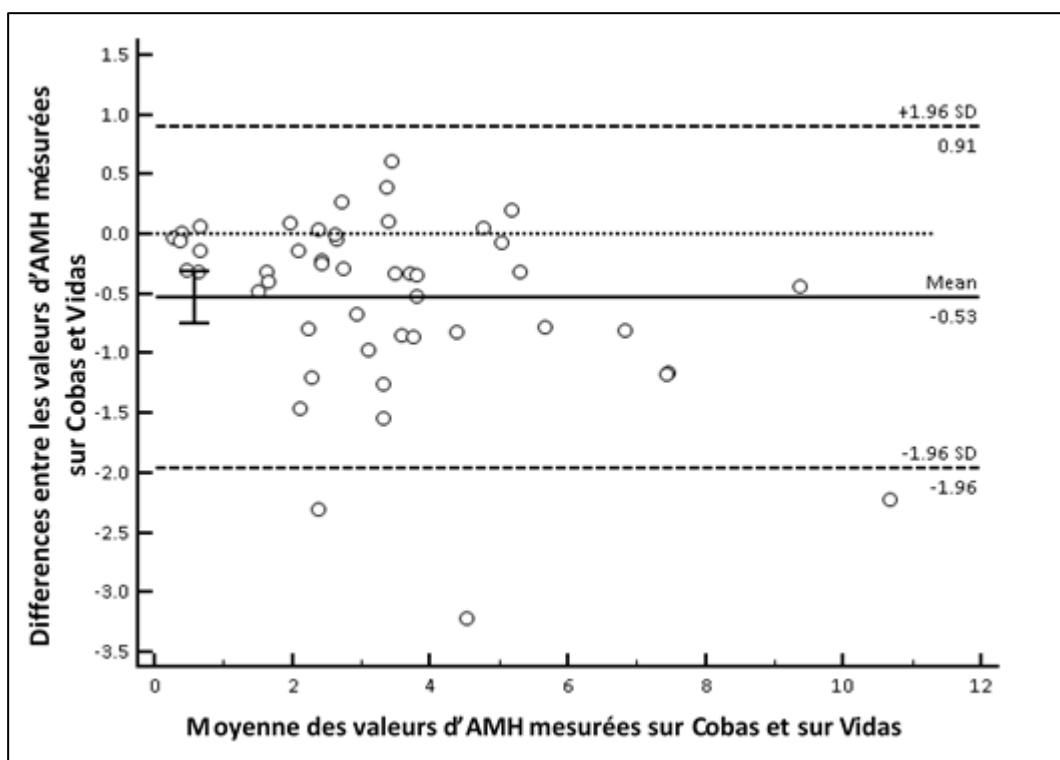


Figure 26. Diagramme de Bland-Altman, résultats d'AMH Cobas® et Vidas®

Le diagramme de Bland-Altman (**Figure 26**) montre les niveaux d'AMH testées pour 50 échantillons, par la technique Roche (Cobas®) et par la technique Biomérieux (Vidas®). On voit ainsi la différence entre les deux dosages en fonction de la moyenne des résultats.

En moyenne, le résultat du test sur Cobas® est de 0,53 ng/mL plus bas que le résultat du test sur Vidas®, avec un taux de 24,39 % plus bas. Les valeurs se situent entre 0,91 et -1,96 ET, avec une différence d'écart type de 0,73 entre les deux tests.

Les échantillons testés sur Vidas® montrent une légère surestimation des taux d'AMH comparativement à ceux du Cobas®. En même temps, il faut s'interroger sur la signification des différences et sur les limites acceptables entre les dosages par rapport à l'impact clinique.

Dans notre série de dosage, une différence significative inexplicable (190%) entre les résultats des deux techniques de dosage a été observée pour un échantillon (**Tableau 11**), la valeur obtenue étant plus haute en technique Biomérieux par rapport à Roche. D'après les valeurs de référence de chaque fournisseur, la patiente 4 aurait une réserve ovarienne faible en la testant par technique Roche et une valeur normale d'après Biomérieux. Cela aurait donc un impact clinique important, qui poserait un problème diagnostique. Un repassage du test aurait été intéressant, mais du fait du volume important d'échantillon requis pour l'analyse (200 µL), on n'a pas eu la possibilité de refaire le dosage sur Vidas®.

Trois autres différences significatives ont été observées (109%, 105% et 96,77%) entre les résultats des deux techniques, cela sans impact clinique.

Tableau 11. Différence des résultats d'AMH sur les automates Cobas® et Vidas®

	AMH Cobas® ng/mL	AMH Vidas® ng/mL	Différence	Moyenne	Différence %
Patiente 4	1,21	3,51	-2,30	2,36	190,00
Patiente 6	2,93	6,14	-3,21	4,53	109,56
Patiente 9	1,38	2,83	-1,46	2,11	105,80
Patiente 41	0,31	0,61	-0,30	0,46	96,77

Conclusion générale: globalement, la comparaison de méthode Cobas® vs Vidas® donne une bonne concordance et une bonne corrélation entre les deux dosages. Les différences sont à interpréter par rapport à l'impact clinique.

III.1.2 Cobas® versus Lumipulse®

III.1.2.1 Courbe de régression linéaire

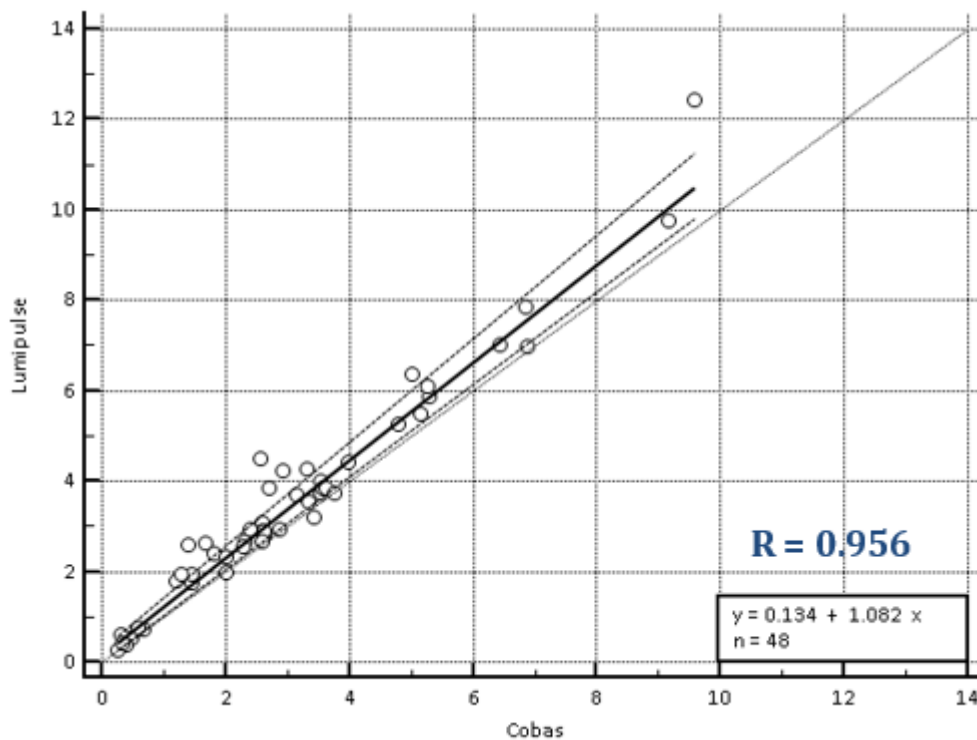


Figure 27. Droite de régression linéaire des résultats Cobas® vs Lumipulse®

La corrélation entre les résultats du Cobas® et ceux du Lumipulse® a été déterminée par la droite de régression linéaire de Passing et Bablok (**Figure 27**). Les valeurs négatives non interprétables (n=2) ont été exclues du calcul.

Tous les échantillons testés (n=48) se situent dans la plage dynamique de quantification des deux dosages : plage linéaire de 0,25 ng/mL à 9,57 ng/mL pour Cobas® et de 0,28 ng/mL à 12,42 ng/mL pour Lumipulse®. Comme vu sur la droite de régression linéaire, il y a une corrélation positive et significative ($R = 0,956$) entre les niveaux d'AMH obtenus pour les mêmes échantillons avec les deux tests.

Conclusion : la courbe de régression linéaire est conforme

III.1.2.2 Diagramme de Bland-Altman

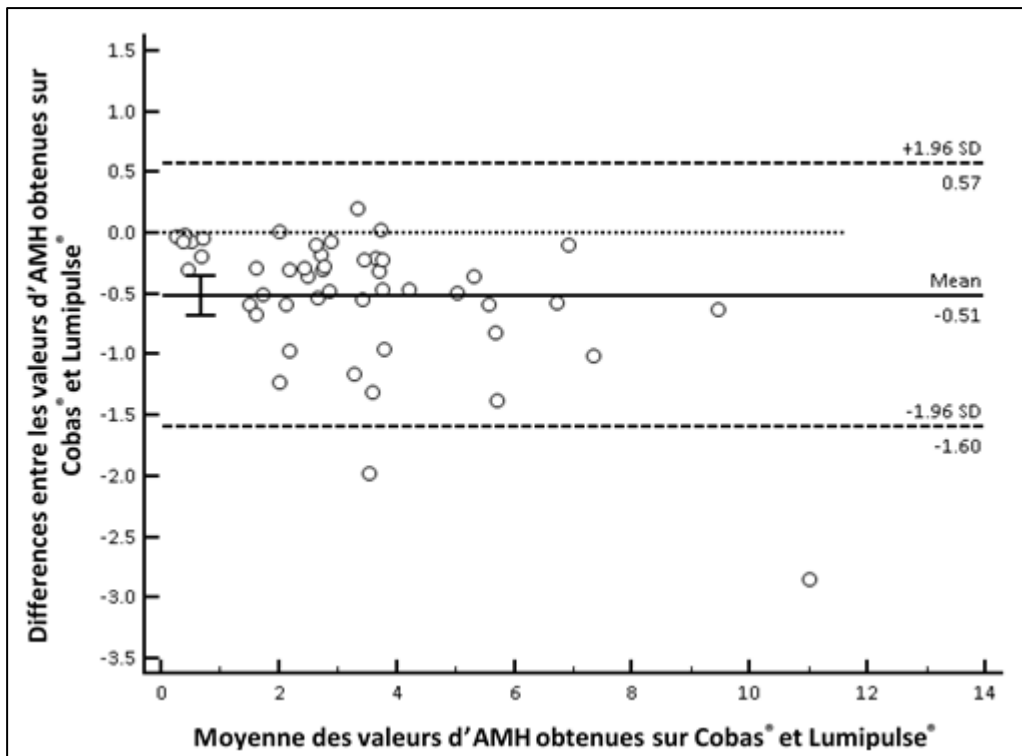


Figure 28. Diagramme de Bland-Altman, résultats d'AMH Cobas® et Lumipulse®

Le diagramme de Bland-Altman (**Figure 28**) montre les niveaux d'AMH testés pour 50 échantillons, par la technique Roche (Cobas®) et par la technique Fujirébio (Lumipulse®). On voit ainsi la différence entre les deux dosages en fonction de la moyenne des résultats.

En moyenne, le résultat du test sur Cobas® est de 0,51 ng/mL plus bas que le résultat du test sur Lumipulse®, avec un taux de 21,24 % plus bas. Les valeurs se situent entre 0,57 et -1,60 ET, avec une différence d'écart type de 0,55 entre les deux tests.

Les échantillons testés sur Lumipulse® montrent une légère surestimation des taux d'AMH comparativement à ceux du Cobas®. Comme vu précédemment pour la technique Biomérieux il faut s'interroger sur la signification des différences et sur les limites acceptables entre les dosages par rapport à l'impact clinique.

Dans notre série de dosage, une différence significative (96,77%) entre les résultats des deux techniques de dosage a été observée pour un échantillon (**Tableau 12**), la valeur obtenue étant plus haute en technique Fujirébio par rapport à Roche.

Tableau 12. Différence des résultats d'AMH sur les automates Cobas® et Lumipulse®

	AMH Cobas® ng/mL	AMH Lumipulse® ng/mL	Difference	Moyenne	Difference %
Patiente 41	0,31	0,61	-0,30	0,46	96,77

D'après les valeurs de référence de chaque fournisseur, la patiente 41 aurait une réserve ovarienne faible en la testant par technique Roche et une valeur normale d'après Fujirébio. Cela aurait donc un impact clinique important, qui poserait un problème diagnostique. Un repassage du test aurait été intéressant, mais en raison d'une quantité faible de sérum dans l'échantillon, on n'a pas eu la possibilité de refaire le dosage sur Lumipulse®.

A part cela, d'autres différences notables entre les résultats des deux techniques n'ont pas été remarquées.

Conclusion: globalement, la comparaison de méthode Cobas® vs Lumipulse® donne une bonne concordance et une bonne corrélation entre les deux dosages. Les différences sont à interpréter par rapport à l'impact clinique.

Conclusion générale: ces nouveaux kits d'AMH misent sur le marché par les sociétés Biomérieux et Fujirébio, disponibles pour Vidas®, respectivement pour Lumipulse® offrent des alternatives à l'utilisation du kit Roche, aux laboratoires de biologie médicale.

III.2 Valeurs de référence

Les valeurs de l'AMH doivent être interprétées selon la technique de dosage utilisée, car en l'absence de standard international chaque fournisseur a établi ses propres valeurs de référence en fonction de la cohorte testée.

De plus, il est recommandé à chaque laboratoire de vérifier la validité des valeurs proposées et d'établir au besoin ses propres valeurs de référence selon la population examinée, en fonction de facteurs géographiques, liés au patient, et environnementaux.

Deux études ont observé des valeurs d'AMH sériques 25% plus basses pour une même tranche d'âge, chez les femmes hispaniques et noires comparativement aux caucasiennes (44).

III.2.1 Valeurs de référence Roche

Les valeurs de référence ont été obtenues avec Elecsys® AMH Plus, lors d'une étude sur une population caucasienne incluant 887 échantillons de femmes en bonne santé et 149 femmes présentant un SOPK.

Tableau 13. Valeurs de référence Roche

Femmes en bonne santé sans contraceptifs oraux	N.	2,5° perc. ng/mL (pmol/L)	5° perc. ng/mL (pmol/L)	Médiane perc. ng/mL (pmol/L)	95° perc. ng/mL (pmol/L)	97,5° perc. ng/mL (pmol/L)
20 – 24 ans	150	1,22 (8,71)	1,52 (10,9)	4,00 (28,6)	9,95 (71,0)	11,7 (83,6)
25 – 29 ans	150	0,890 (6,35)	1,20 (8,57)	3,31 (23,6)	9,05 (64,6)	9,85 (70,3)
30 – 34 ans	138	0,576 (4,11)	0,711 (5,08)	2,81 (20,0)	7,59 (54,2)	8,13 (58,0)
35 – 39 ans	138	0,147 (1,05)	0,405 (2,89)	2,00 (14,2)	6,96 (49,7)	7,49 (53,5)
40 – 44 ans	142	0,027 (0,193)	0,059 (0,421)	0,822 (6,29)	4,44 (31,7)	5,47 (39,1)
45 – 50 ans	169	0,010 (0,071)	0,010 (0,071)	0,194 (1,39)	1,79 (12,8)	2,71 (19,3)
Femmes présentant un SOPK*	N.	2,5° perc. ng/mL (pmol/L)	5° perc. ng/mL (pmol/L)	Médiane perc. ng/mL (pmol/L)	95° perc. ng/mL (pmol/L)	97,5° perc. ng/mL (pmol/L)
	149	2,41 (13,3)	3,12 (17,2)	6,81 (48,6)	12,6 (122)	17,1 (135)

Le nombre élevé de patientes testées et la segmentation qui va de 2,5° à 97,5° percentiles offre un très bon aperçu des limites acceptables pour un résultat donné.

III.2.2 Valeurs de référence Fujirébio

Les échantillons de sérum obtenus de 600 sujets féminins de la population asiatique apparemment sains (âgés de 22 à 45 ans) et de 40 sujets diagnostiqués SOPK ont été dosés avec Lumipulse G® AMH. L'intervalle de confiance à 95%, les limites inférieures et supérieures et les médianes de la plage de référence sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 14. Valeurs de référence Fujirébio

		N	Intervalle de référence de 95 % (ng/mL)	Médiane (ng/mL)
Sujets féminins apparemment sains	Tous (âgés de 22 à 45 ans)	600	<0.030 - 8.609	1.069
	Âgés de 22 à 25 ans	120	0.278 - 8.011	2.196
	Âgés de 26 à 30 ans	120	0.287 - 12.242	2.696
	Âgés de 31 à 35 ans	120	0.065 - 10.042	1.557
	Âgés de 36 à 40 ans	120	<0.030 - 9.232	1.124
	Âgés de 41 à 45 ans	120	<0.030 - 4.480	0.398
Sujets diagnostiqués PCOS	N		2.5e - 97.5e Percentile (ng/mL)	Médiane (ng/mL)
	40		0.049 -12.162	2.537

Une approche plus élargie par tranche d'âge aurait été utile. La division par percentile aurait pu offrir un meilleur aperçu des valeurs acceptables pour un résultat donné. La présentation des valeurs par tranche d'âge, semble être un peu exhaustive, pouvant poser des difficultés diagnostiques. Des valeurs de référence pour une tranche d'âge en dessous de 22 ans seraient utiles.

Par rapport à la technique Roche, les valeurs de référence établies par Fujirébio pour les résultats bas sont situées largement plus bas.

III.2.3 Valeurs de référence Biomérieux

Les valeurs de référence ont été obtenues avec le test VIDAS® AMH en utilisant 435 échantillons de sérum provenant de femmes européennes apparemment en bonne santé entre 12 et 44 ans. Les femmes sélectionnées ne prenaient pas de contraception hormonale et celles de plus de 18 ans avaient des cycles menstruels réguliers.

Tableau 15. Valeurs de référence Biomérieux

Tranche d'âge	N	5 ^{ème} perc. ng/mL [IC 90%]*	10 ^{ème} perc. ng/mL [IC 90%]	50 ^{ème} perc. ng/mL [IC 90%]	90 ^{ème} perc. ng/mL [IC 90%]	95 ^{ème} perc. ng/mL [IC 90%]
12 -17 ans	45 **	-	1,57 [0,81 ; 2,01]	3,63 [3,16 ; 4,82]	7,60 [6,75 ; > 9,00]	-
18 - 24 ans	68	1,62 [1,28 ; 2,37]	2,15 [1,35 ; 2,92]	4,37 [4,10 ; 5,12]	8,40 [6,93 ; > 9,00]	> 9,00 [7,93 ; > 9,00]
25 - 29 ans	88	1,20 [0,56 ; 1,56]	1,56 [1,08 ; 1,83]	3,23 [2,82 ; 3,76]	8,76 [7,56 ; > 9,00]	> 9,00 [8,75 ; > 9,00]
30 - 34 ans	103	0,80 [0,57 ; 1,19]	1,19 [0,86 ; 1,48]	3,55 [3,19 ; 3,95]	7,00 [6,27 ; 7,76]	8,18 [7,02 ; > 9,00]
35 - 39 ans	65	0,11 [0,06 ; 0,38]	0,36 [0,10 ; 0,70]	1,84 [1,41 ; 2,35]	5,15 [3,54 ; 6,81]	6,72 [5,07 ; > 9,00]
40 - 44 ans	66	0,10 [< 0,01 ; 0,18]	0,17 [0,09 ; 0,20]	0,98 [0,76 ; 1,40]	3,84 [2,41 ; 5,96]	5,78 [3,64 ; 8,73]

La segmentation des valeurs qui va de 5^e à 95^e percentiles offre un très bon aperçu des limites acceptables pour un résultat donné.

Néanmoins, des bornes plus précises avec des valeurs d'AMH obtenues après dilution sont à prévoir car cela peut aider en cas de suspicion de SOPK. Sinon, des confusions diagnostiques peuvent apparaître en l'absence d'autres critères cliniques, surtout pour les jeunes femmes chez lesquelles on retrouve des valeurs physiologiquement plus hautes.

Des bornes pour les résultats des femmes diagnostiquées avec SOPK seraient également utiles.

IV. Discussions

IV.1 Interprétation des résultats en vue diagnostique

En l'absence de standard international, la comparaison des résultats de différents kits est difficile. Les valeurs de l'AMH doivent être interprétées selon la technique de dosage utilisée, en fonction des valeurs du fournisseur obtenues sur une cohorte testée.

Les problématiques rencontrées face à des résultats similaires entre deux techniques de dosage, sont liées au diagnostic des patientes, en raison de valeurs de référence différentes entre technique.

Il se peut que pour un résultat identique ou peu différent, le diagnostic ne soit pas le même en fonction de la technique de dosage utilisée ce qui met en difficulté les cliniciens. C'est le cas pour 11 patientes de la série d'échantillons testés. Dans le **Tableau 16** on a regroupé toutes les différences de diagnostic qu'on a rencontré dans la série.

Tableau 16. Différences de diagnostic en fonction de la technique utilisée

	Age	AMH Cobas ng/mL	AMH Vidas ng/mL	AMH Lumipulse ng/mL
Patiente 1 Diagnostic	26	0,48 ↓	0,79 ↓	0,54 Normal
Patiente 4 Diagnostic	21	1,21 ↓	3,51 Normal	1,79 Normal
Patiente 10 Diagnostic	32	0,38 ↓	0,37 ↓	0,39 Normal
Patiente 13 Diagnostic	32	0,25 ↓	0,27 ↓	0,28 Normal
Patiente 20 Diagnostic	20	2,62 Normal	2,62 Normal	2,89 Ø bornes

Patiente 25 Diagnostic	24	1,46 ↓	1,77 Normal	1,75 Normal
Patiente 31 Diagnostic	20	9,57 Normal	11,79 ↑? (pas de dilution)	12,42 ∅ bornes
Patiente 41 Diagnostic	29	0,31 ↓	0,61 ↓	0,61 Normal
Patiente 45 Diagnostic	39	0,34 ↓	0,39 Normal	0,41 Normal
Patiente 46 Diagnostic	22	9,15 Normal	9,58 ↑? (pas de dilution)	9,78 ↑
Patiente 49 Diagnostic	24	0,59 ↓	0,73 ↓	0,78 Normal

Le Conseil national professionnel de biologie médicale insiste sur le besoin d'un standard international afin de diminuer la variabilité inter-laboratoire et d'améliorer la sécurité des patients en évitant la mauvaise estimation des valeurs.

En attendant, le « gold-standard » serait représenté par les valeurs de référence établies par la société Roche, avec une plus grande expérience sur le marché, le kit Elecsys® AMH représentant le premier test standardisé, automatisé et approuvé par l'agence américaine des produits médicamenteux (FDA) (93).

IV.2 D'autres études comparatives sur Lumipulse® et Vidas®

Conformément aux fiches techniques des fournisseurs, d'autres études comparatives ont été menées afin de s'apercevoir des performances et des différences analytiques et d'observer si une corrélation des résultats existent avec d'autres techniques de dosage.

IV.2.1 Etudes comparatives sur Lumipulse®

Une comparaison de la méthode de dosage Lumipulse G AMH® a été réalisée sur le système Lumipulse G1200® dans une étude conforme aux directives du protocole CLSI

EP09c. La méthode de régression pondérée Deming a été utilisée pour comparer les performances du dosage Lumipulse G AMH® à la méthode de dosage Roche Elecsys® AMH. Les résultats des échantillons dosés étaient compris entre 0,073 et 21,168 ng/mL pour le dosage Lumipulse G AMH® et entre 0,067 et 19,310 ng/mL pour le dosage Roche Elecsys® AMH (**Tableau 17**).

Tableau 17. Comparaison méthodes Lumipulse G1200® - Roche Elecsys®

Lumipulse G AMH vs Elecsys AMH				
n	Coefficient de corrélation (r)	Ordonnée à l'origine (95 % CI)	Pente (95 % CI)	Écart moyen (ng/mL)
139	0.998	-0.015 -0.031 à 0.002	1.133 1.106 à 1.160	0.648

Une deuxième comparaison de méthode de dosage Lumipulse G® - Elecsys® a été réalisée sur le système Lumipulse G1200®. La méthode de régression pondérée Deming a été utilisée pour comparer les performances du dosage Lumipulse G® AMH aux celles du Roche Elecsys® AMH. Les échantillons dosés étaient compris entre 0,073 et 51,200 ng/mL pour le dosage Lumipulse G® AMH et entre 0,067 et 44,360 ng/mL pour le dosage Roche Elecsys AMH® (**Tableau 18**).

Tableau 18. Comparaison méthodes Lumipulse G1200® - Roche Elecsys®

Lumipulse G AMH vs Elecsys AMH				
n	Coefficient de corrélation (r)	Ordonnée à l'origine (95 % CI)	Pente (95 % CI)	Écart moyen (ng/mL)
145	0.994	-0.015 -0.032 à 0.002	1.136 1.109 à 1.162	0.874

Les résultats des deux comparaisons montrent une très bonne corrélation des deux techniques, avec des coefficients de corrélation élevés (0,99).

IV.2.2 Etudes comparatives sur Vidas®

Une étude comparative a été réalisée selon les recommandations CLSI® EP09-A3. 118 échantillons de sérum de patients de plus de 12 ans (prélevés en pratique courante dans 2 laboratoires) ont été collectés et testés simultanément en utilisant le test VIDAS® AMH et un autre test immunologique disponible dans le commerce.

La comparaison du test VIDAS® AMH (Y) avec un autre test immunologique disponible dans le commerce (X) a été évaluée par la régression linéaire de Passing & Bablok (**Figure 29**).

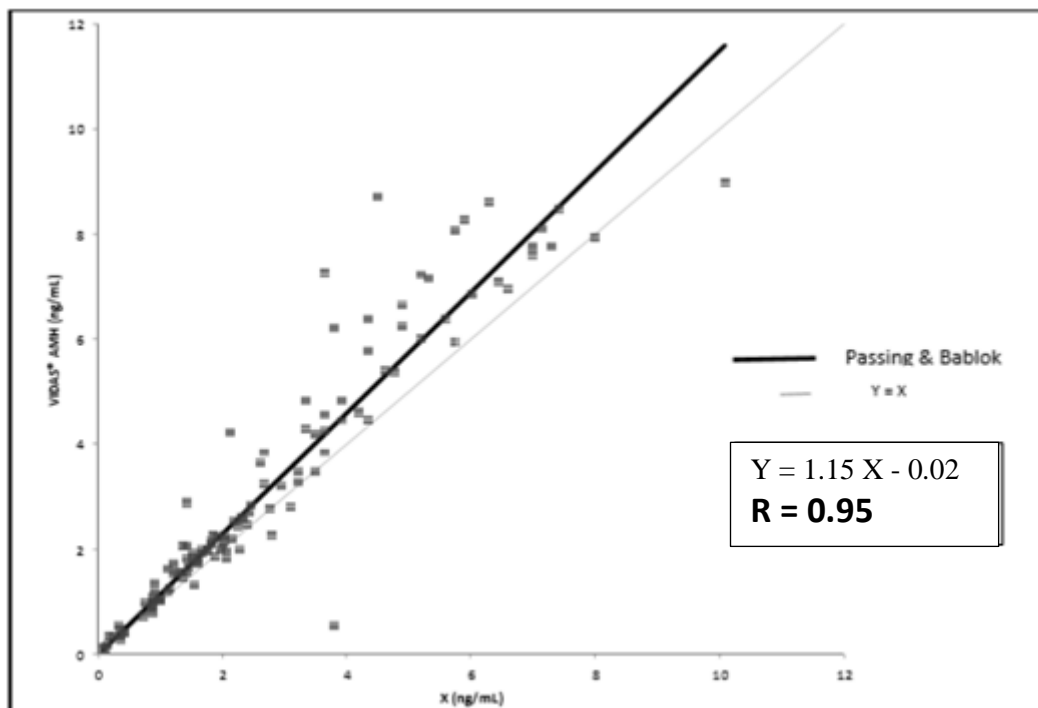


Figure 29. Droite de régression linéaire des résultats d'AMH - Vidas® vs X®

Les résultats montrent une bonne corrélation des deux techniques, avec un coefficient de corrélation à 0,95.

IV.3 Regard personnel sur les automates testés

Vu que j'ai participé à la réalisation des dosages, j'ai eu un aperçu de chaque automate, que j'ai résumé dans le **Tableau 19**, sous forme de points forts et faibles pour chacun d'entre les trois analyseurs dont on s'est servi pour la présente étude.

Tableau 19. Aperçu des automates utilisés dans l'étude

Analyseur	Avantages	Inconvénients
Cobas e 601®	<ul style="list-style-type: none"> ○ Facile d'utilisation ○ Faible volume d'échantillon = 50 µL ○ Rendu rapide de résultats = 18 min ○ Large plage de mesure ○ Réactif stable 8 semaines sur l'analyseur ○ Valeurs de référence précises ne laissant pas de place à des confusions au moment du diagnostic 	-
Vidas®	<ul style="list-style-type: none"> ○ Facile d'utilisation ○ Principe de cartouche de test unique prête à l'emploi ○ Le kit comprend tout le nécessaire pour la réalisation du test 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Volume important d'échantillon = 200 µL ○ Résultat du test en 35 min ○ Plage de mesure restreinte (dilution manuelle à faire pour les valeurs >9 ng/mL) ○ Valeurs de référence pas précises, les valeurs hautes (>9 ng/mL) non diluées ○ Absence de valeurs de référence pour le SOPK
Lumipulse®	<ul style="list-style-type: none"> ○ Facile d'utilisation ○ Test possible sur sérum et plasma (plusieurs types de tubes) ○ Large plage de mesure 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Volume important d'échantillon = 160 µL pour les cuvettes / 310 µL pour les tubes ○ Absence de segmentation par percentiles des valeurs de référence

IV.4 Inscription de l'AMH à la NABM

Depuis 2015, la Direction générale de l'offre de soins (DGOS) a mis en place une prise en charge dérogatoire et transitoire des actes hors nomenclature (HN) de biologie médicale et d'anatomocytopathologie, via la MERRI G03 «Actes HN». Cette prise en charge, fixée par l'instruction n°DGOS/PF4/2015/258 du 31 juillet 2015, repose sur deux listes: le Référentiel des actes innovants hors nomenclature (RIHN) et la Liste complémentaire (LC) composée d'actes HN initialement innovants, mais désormais utilisés en soins courants et susceptibles de faire l'objet d'une évaluation par la HAS, compte tenu de leur niveau suffisant de validation clinique estimé par les sociétés savantes. Dans ce cadre, la HAS a décidé en 2017 de s'autosaisir pour évaluer la pertinence de l'acte de dosage de l'hormone anti-müllérienne (AMH, code I003 de la LC) en vue de son inscription à la Nomenclature des actes de biologie médicale (NABM). A présent, l'AMH ne fait pas partie des analyses prise en charge par la caisse primaire d'assurance maladie, malgré sa large prescription en clinique.

CONCLUSION

Le dosage de l'AMH est un acte d'hormonologie largement prescrit actuellement en France.

L'évaluation de la réserve ovarienne est considérée comme un paramètre important dans le bilan de fertilité des femmes. Elle est représentée par le stock de follicules primordiaux. De plus, elle est corrélée au nombre d'ovocytes qui pourront être recueillis.

L'âge est un marqueur incontournable dans l'évaluation de la réserve ovarienne en raison du vieillissement physiologique.

Un certain nombre de marqueurs hormonaux tels que la FSH, l'E2 et l'inhibine B ont aussi été identifiés comme marqueurs de la réserve ovarienne (60) pour la prédiction d'une réponse à la stimulation. Cependant, ces mesures présentent une valeur prédictive limitée souvent parce qu'elles sont des mesures indirectes de la réserve ovarienne (FSH et E2), ou ont une variabilité inter-cycles substantielle (FSH) ou encore présentent une grande variabilité intra-cycle (FSH, E2, inhibine B) (60).

Le compte de follicules antraux entre 2 et 10 mm visibles en échographie pelvienne est également largement utilisé comme marqueur de la réserve ovarienne. Le nombre de follicules antraux au 3^{ème} jour possède une valeur prédictive des réponses ovariennes faible et excessive.

Il est admis aujourd'hui que l'AMH doive entrer dans tous les bilans biologiques d'exploration de l'infertilité, étant considérée aujourd'hui comme le meilleur marqueur biologique pour évaluer la réserve ovarienne (3)(58), ayant l'avantage d'être stable au cours du cycle menstruel (60). Son dosage est très utilisé en assistance médicale à la procréation car le taux d'AMH plasmatique reflète le nombre de follicules en croissance (59).

Dans ce cadre, la HAS a décidé en 2017 de s'autosaisir pour évaluer la pertinence de l'acte de dosage de l'hormone anti-müllérienne (AMH, code I003 de la LC) en vue de son inscription à la Nomenclature des actes de biologie médicale (NABM). A présent, l'AMH ne fait pas partie des analyses prise en charge par la caisse primaire d'assurance maladie, malgré sa large prescription en clinique.

En l'absence de standard international disponible et du fait de calibrations différentes, les résultats obtenus par les différentes techniques de dosage ne sont pas identiques. Les valeurs seuil publiées dans la littérature jusqu'à ce jour sont donc technique-dépendantes.

Le Conseil national professionnel de biologie médicale recommande d'exprimer les résultats du dosage de l'AMH dans les deux unités (ng/mL et pmol/L) qui peuvent être utilisées et conseille de se reporter aux préconisations du fournisseur de la trousse de dosage pour les conditions préanalytiques et analytiques à respecter, ainsi que d'interpréter les valeurs selon la technique de dosage utilisée (52).

Dans notre étude, malgré une bonne concordance entre les techniques de dosage, on a remarqué encore une fois l'importance d'un standard international d'un point de vue diagnostique. Les conseils nationaux professionnels médicaux insistent fermement sur la nécessité de mettre en place un standard international afin de faciliter le développement de valeurs de référence, diminuer la variabilité inter-laboratoire et le coût dû aux dosages répétés ainsi que pour améliorer la sécurité des patients en évitant la mauvaise estimation des valeurs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Mullerian Inhibiting Substance: An Instructive Developmental Hormone with Diagnostic and Possible Therapeutic Applications. :18.
2. Ichas F, Faucounau N, Stoll R, Maraud R. Action of testosterone on the anti-Mullerian activity of the chick embryonic testis assayed in vivo by organotypic grafting. *Anat Embryol* [Internet]. sept 1994 [cité 20 nov 2019];190(3). Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/BF00234307>
3. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, et al. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Human Reproduction Update*. 1 mai 2014;20(3):370-85.
4. Christian CA, Moenter SM. The Neurobiology of Preovulatory and Estradiol-Induced Gonadotropin-Releasing Hormone Surges. *Endocrine Reviews*. août 2010;31(4):544-77.
5. Giacobini P, Parkash J, Campagne C, Messina A, Casoni F, Vanacker C, et al. Brain Endothelial Cells Control Fertility through Ovarian-Steroid-Dependent Release of Semaphorin 3A. Harris WA, éditeur. *PLoS Biology*. 11 mars 2014;12(3):e1001808.
6. Kim T, Do M-HT, Lawson MA. Translational control of gene expression in the gonadotrope. *Molecular and Cellular Endocrinology*. mars 2014;385(1-2):78-87.
7. Garrel G, Racine C, L'Hôte D, Denoyelle C, Guigon CJ, di Clemente N, et al. L'hormone anti-müllérienne : un nouveau régulateur des cellules gonadotropes hypophysaires: Implication dans le dimorphisme sexuel de l'activité gonadotrope avant la puberté. *médecine/sciences*. déc 2016;32(12):1076-8.
8. Hugon J, Ouzounian S, Christin-Maître S. Hormone antimüllérienne : du gène à la protéine, sa place en clinique. *Annales d'Endocrinologie*. mars 2010;71(2):83-8.
9. Picard J-Y, Josso N. Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Molecular and Cellular Endocrinology*. janv 1984;34(1):23-9.
10. Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarrás P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. déc 2003;211(1-2):21-31.
11. Josso N, di Clemente N, Gouédard L. Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. juin 2001;179(1-2):25-32.
12. Rzeszowska M, Leszcz A, Putowski L, Hałabiś M, Tkaczuk-Włach J, Kotarski J, et al. Anti-Müllerian hormone: structure, properties and appliance. *Ginekologia Polska*. 30 sept 2016;87(9):669-74.
13. Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG, Jayaprakasan K, et al. Which follicles make the most anti-Mullerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection. *Molecular Human Reproduction*. 1 août 2013;19(8):519-27.
14. Behringer RR. 5 The in Vivo Roles of Müllerian-inhibiting Substance. In: *Current Topics in Developmental Biology* [Internet]. Elsevier; 1994 [cité 4 avr 2019]. p. 171-87. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0070215308605505>

15. Boron W, Boulpaep E. Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach. 3^e éd. 2017.
16. Nelson RJ. An Introduction to Behavioral Endocrinology, Fourth Edition. :9.
17. Lebeurrier N, Launay S, Macrez R, Maubert E, Legros H, Leclerc A, et al. Anti-Müllerian-hormone-dependent regulation of the brain serine-protease inhibitor neuroserpin. *Journal of Cell Science*. 15 oct 2008;121(20):3357-65.
18. Wang P-Y, Protheroe A, Clarkson AN, Imhoff F, Koishi K, McLennan IS. Müllerian inhibiting substance contributes to sex-linked biases in the brain and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 28 avr 2009;106(17):7203-8.
19. Catteau-Jonard S, Dewailly D, Prévot V, Cimino I, Giacobini P. L'hormone anti-müllérienne: Une hormone ovarienne exerçant une rétroaction hypothalamique ? *médecine/sciences*. mai 2016;32(5):441-4.
20. Josso N, Belville C, di Clemente N, Picard J-Y. AMH and AMH receptor defects in persistent Müllerian duct syndrome. *Human Reproduction Update*. 1 juill 2005;11(4):351-6.
21. Thibault E, Mirallié S, Al Hussein Y, Jean M, Bouchot O, Barrière P. Anti-müllerian hormone as a spermatogenesis marker in non-obstructive azoospermia? *Fertility and Sterility*. sept 2003;80:239.
22. Young J, Chanson P, Salenave S, Noël M, Brailly S, O'Flaherty M, et al. Testicular Anti-Müllerian Hormone Secretion Is Stimulated by Recombinant Human FSH in Patients with Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. févr 2005;90(2):724-8.
23. Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T, et al. Dynamic assays of inhibin B, anti-Müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Human Reproduction*. 1 nov 2005;20(11):3178-83.
24. Aksglaede L, Olesen IA, Carlsen E, Petersen JH, Juul A, Jørgensen N. Serum concentration of anti-Müllerian hormone is not associated with semen quality. *Andrology*. mars 2018;6(2):286-92.
25. Andersen JM, Herning H, Witczak O, Haugen TB. Anti-Müllerian hormone in seminal plasma and serum: association with sperm count and sperm motility. *Human Reproduction*. août 2016;31(8):1662-7.
26. Hamamah S, Anahory T. Médecine et biologie de la reproduction: des gamètes à la conception. Issy-les-Moulineaux: Masson; 2004.
27. Mcgee EA, Hsueh AJW. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. 2000;21(2):15.
28. Durlinger A, Visser J, Themmen A. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*. 1 nov 2002;601-9.
29. di Clemente N, Seroka A, Sonigo C, Pierre A, Taieb J, Grynberg M. L'hormone anti-müllérienne : nouveautés physiologiques et expérimentales chez la femme. 2019;16:13.
30. Visser JA, Schipper I, Laven JSE, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency. *Nature Reviews Endocrinology*. juin 2012;8(6):331-41.

31. Durlinger ALL, Kramer P, Karels B, Jong FHD, Uilenbroek JTJ, Grootegoed JA, et al. Control of Primordial Follicle Recruitment by Anti-Müllerian Hormone in the Mouse Ovary. 1999;140(12):8.
32. Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, et al. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*. nov 2011;96(5):1246-1251.e1.
33. de Vet A, Laven JSE, de Jong FH, Themmen APN, Fauser BCJM. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertility and Sterility*. févr 2002;77(2):357-62.
34. Maheshwari A, Fowler P, Bhattacharya S. Assessment of ovarian reserve—should we perform tests of ovarian reserve routinely? *Human Reproduction*. nov 2006;21(11):2729-35.
35. Fouquet A, Catteau-Jonard S, Peigné M, Pigny P, Dewailly D. Usefulness and indications of AMH assay in women. *Annales de Biologie Clinique*. 201411-12;(6):681–688.
36. Visser JA, Durlinger ALL, Peters IJJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, et al. Increased Oocyte Degeneration and Follicular Atresia during the Estrous Cycle in Anti-Müllerian Hormone Null Mice. *Endocrinology*. mai 2007;148(5):2301-8.
37. Carlsson IB. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Human Reproduction*. 3 juin 2006;21(9):2223-7.
38. Kelsey TW, Wright P, Nelson SM, Anderson RA, Wallace WHB. A Validated Model of Serum Anti-Müllerian Hormone from Conception to Menopause. Vitzthum VJ, éditeur. *PLoS ONE*. 15 juill 2011;6(7):e22024.
39. Andersson A-M, Ller JM, Skakkeb NE. Different Roles of Prepubertal and Postpubertal Germ Cells and Sertoli Cells in the Regulation of Serum Inhibin B Levels. 1998;83(12):8.
40. Lie Fong S, Visser JA, Welt CK, de Rijke YB, Eijkemans MJC, Broekmans FJ, et al. Serum Anti-Müllerian Hormone Levels in Healthy Females: A Nomogram Ranging from Infancy to Adulthood. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1 déc 2012;97(12):4650-5.
41. Seifer DB, Baker VL, Leader B. Age-specific serum anti-Müllerian hormone values for 17,120 women presenting to fertility centers within the United States. *Fertility and Sterility*. févr 2011;95(2):747-50.
42. Tehrani FR, Solaymani-Dodaran M, Tohidi M, Gohari MR, Azizi F. Modeling Age at Menopause Using Serum Concentration of Anti-Müllerian Hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. févr 2013;98(2):729-35.
43. Dólleman M, Faddy MJ, van Disseldorp J, van der Schouw YT, Messow CM, Leader B, et al. The Relationship Between Anti-Müllerian Hormone in Women Receiving Fertility Assessments and Age at Menopause in Subfertile Women: Evidence From Large Population Studies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1 mai 2013;98(5):1946-53.
44. La Marca A, Grisendi V, Griesinger G. How Much Does AMH Really Vary in Normal Women? *International Journal of Endocrinology*. 2013;2013:1-8.
45. Kallio S, Puurunen J, Ruokonen A, Vaskivuo T, Piltonen T, Tapanainen JS. Antimüllerian hormone levels decrease in women using combined contraception independently of administration route. *Fertility and Sterility*. avr 2013;99(5):1305-10.

46. Dechanet C, Anahory T, Mathieu Daude JC, Quantin X, Reyftmann L, Hamamah S, et al. Effects of cigarette smoking on reproduction. *Human Reproduction Update*. 1 janv 2011;17(1):76-95.
47. Freour T, Dessolle L, Jean M, Masson D, Barriere P. Predictive value of ovarian reserve markers in smoking and non-smoking women undergoing IVF. *Reproductive BioMedicine Online*. juin 2010;20(6):857-60.
48. Lehmann P, Vélez MP, Saumet J, Lapensée L, Jamal W, Bissonnette F, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH): a reliable biomarker of oocyte quality in IVF. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. avr 2014;31(4):493-8.
49. Andersen AN, Witjes H, Gordon K, Mannaerts B, on behalf of the Xpect investigators. Predictive factors of ovarian response and clinical outcome after IVF/ICSI following a rFSH/GnRH antagonist protocol with or without oral contraceptive pre-treatment. *Human Reproduction*. 1 déc 2011;26(12):3413-23.
50. Broer SL, van Disseldorp J, Broeze KA, Dolleman M, Opmeer BC, Bossuyt P, et al. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. *Human Reproduction Update*. 1 janv 2013;19(1):26-36.
51. Casadei L, Manicuti C, Puca F, Madrigale A, Emidi E, Piccione E. Can anti-Müllerian hormone be predictive of spontaneous onset of pregnancy in women with unexplained infertility? *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. nov 2013;33(8):857-61.
52. Patricia MF. Haute Autorité de santé. :147.
53. Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, et al. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Human Reproduction Update*. 1 mai 2014;20(3):334-52.
54. Nelson SM, La Marca A. The journey from the old to the new AMH assay: how to avoid getting lost in the values. *Reproductive BioMedicine Online*. oct 2011;23(4):411-20.
55. Meczekalski B, Czyzyk A, Kunicki M, Podfigurna-Stopa A, Plociennik L, Jakiel G, et al. Fertility in women of late reproductive age: the role of serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels in its assessment. *Journal of Endocrinological Investigation*. nov 2016;39(11):1259-65.
56. Aydogan B, Mirkin S. The utility of measuring anti-Müllerian hormone in predicting menopause. *Climacteric*. 2 nov 2015;18(6):777-89.
57. Slama R. La fertilité des couples en France. :5.
58. La Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, Fauser BC, Macklon NS, on behalf of the ESHRE Special Interest Group for Reproductive Endocrinology - AMH Round Table. Anti-Mullerian hormone (AMH): what do we still need to know? *Human Reproduction*. 1 sept 2009;24(9):2264-75.
59. Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N, Craig LB. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertility and Sterility*. janv 2011;95(1):170-5.
60. Park HJ, Lee GH, Gong DS, Yoon TK, Lee WS. The meaning of anti-Müllerian hormone levels in patients at a high risk of poor ovarian response. *Clin Exp Reprod Med*. 2016;43(3):139.

61. Fleming R, Seifer DB, Frattarelli JL, Ruman J. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reproductive BioMedicine Online*. oct 2015;31(4):486-96.
62. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of « poor response » to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Human Reproduction*. 1 juill 2011;26(7):1616-24.
63. Nyboe Andersen A, Nelson SM, Fauser BCJM, García-Velasco JA, Klein BM, Arce J-C, et al. Individualized versus conventional ovarian stimulation for in vitro fertilization: a multicenter, randomized, controlled, assessor-blinded, phase 3 noninferiority trial. *Fertility and Sterility*. févr 2017;107(2):387-396.e4.
64. Coskun B, Dilbaz B, Karadag B, Coskun B, Tohma YA, Dur R, et al. The role of anti-Mullerian hormone in predicting the response to clomiphene citrate in unexplained infertility. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. oct 2018;57(5):713-7.
65. Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Discordances between follicle stimulating hormone (FSH) and anti-Müllerian hormone (AMH) in female infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010;8(1):64.
66. Wang S, Zhang Y, Mensah V, Huber WJ, Huang Y-T, Alvero R. Discordant anti-müllerian hormone (AMH) and follicle stimulating hormone (FSH) among women undergoing in vitro fertilization (IVF): which one is the better predictor for live birth? *Journal of Ovarian Research* [Internet]. déc 2018 [cité 15 janv 2019];11(1). Disponible sur: <https://ovarianresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13048-018-0430-z>
67. Morin SJ, Patounakis G, Juneau CR, Neal SA, Scott RT, Seli E. Diminished ovarian reserve and poor response to stimulation in patients <38 years old: a quantitative but not qualitative reduction in performance. *Human Reproduction*. 1 août 2018;33(8):1489-98.
68. Sirmans S, Pate K. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *CLEP*. déc 2013;1.
69. The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction*. 1 janv 2004;19(1):41-7.
70. Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, et al. Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Human Reproduction*. 1 nov 2011;26(11):3123-9.
71. Lujan ME, Jarrett BY, Brooks ED, Reines JK, Peppin AK, Muhn N, et al. Updated ultrasound criteria for polycystic ovary syndrome: reliable thresholds for elevated follicle population and ovarian volume. *Human Reproduction*. 1 mai 2013;28(5):1361-8.
72. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertility and Sterility*. févr 2009;91(2):456-88.
73. Taylor AE, Mccourt B, Martin KA, Anderson EJ, Adams JM, Schoenfeld D, et al. Determinants of Abnormal Gonadotropin Secretion in Clinically Defined Women with Polycystic Ovary Syndrome. 1997;82(7):9.

74. Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, et al. Elevated Serum Level of Anti-Müllerian Hormone in Patients with Polycystic Ovary Syndrome: Relationship to the Ovarian Follicle Excess and to the Follicular Arrest. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. déc 2003;88(12):5957-62.
75. Burt Solorzano CM, Beller JP, Abshire MY, Collins JS, McCartney CR, Marshall JC. Neuroendocrine dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Steroids*. mars 2012;77(4):332-7.
76. Shapiro-Mendoza CK, Barfield WD, Henderson Z, James A, Howse JL, Iskander J, et al. CDC Grand Rounds: Public Health Strategies to Prevent Preterm Birth. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 19 août 2016;65(32):826-30.
77. Hsu JY, James KE, Bormann CL, Donahoe PK, Pépin D, Sabatini ME. Müllerian-Inhibiting Substance/Anti-Müllerian Hormone as a Predictor of Preterm Birth in Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1 nov 2018;103(11):4187-96.
78. Königer A, Kampmeier A, Schmidt B, Frank M, Strowitzki T, Kimmig R, et al. Trends in anti-Müllerian hormone concentrations across different stages of pregnancy in women with polycystic ovary syndrome. *Reproductive BioMedicine Online*. sept 2018;37(3):367-74.
79. Bessiène L, Lombès M, Bouvattier C. Controverses et challenges sur le développement sexuel différent (DSD). *Annales d'Endocrinologie*. sept 2018;79:S22-30.
80. Lindhardt Johansen M, Hagen CP, Johannsen TH, Main KM, Picard J-Y, Jørgensen A, et al. Anti-Müllerian Hormone and Its Clinical Use in Pediatrics with Special Emphasis on Disorders of Sex Development. *International Journal of Endocrinology*. 2013;2013:1-10.
81. Edelsztein NY, Grinspon RP, Schteingart HF, Rey RA. Anti-Müllerian hormone as a marker of steroid and gonadotropin action in the testis of children and adolescents with disorders of the gonadal axis. *Int J Pediatr Endocrinol*. déc 2016;2016(1):20.
82. Ahmed SF, Achermann JC, Arlt W, Balen A, Conway G, Edwards Z, et al. Society for Endocrinology UK guidance on the initial evaluation of an infant or an adolescent with a suspected disorder of sex development (Revised 2015). *Clin Endocrinol*. mai 2016;84(5):771-88.
83. Hoog-Labouret N, Merlet F. Conséquences des traitements des cancers et préservation de la fertilité: État des connaissances et propositions Rapport de l'Institut national du cancer et de l'Agence de la biomédecine. *Oncologie*. mai 2013;15(5):263-70.
84. M. Comtet, J. Benard, M. Grynberg. Préservation de la fertilité féminine. *Gynécologie* [Internet]. 2016; Disponible sur: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0246-1064\(16\)72632-6](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0246-1064(16)72632-6)
85. Anderson RA, Rosendahl M, Kelsey TW, Cameron DA. Pretreatment anti-Müllerian hormone predicts for loss of ovarian function after chemotherapy for early breast cancer. *European Journal of Cancer*. nov 2013;49(16):3404-11.
86. Peigné M, Decanter C. Serum AMH level as a marker of acute and long-term effects of chemotherapy on the ovarian follicular content: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12(1):26.
87. Kim H-A, Choi J, Park CS, Seong M-K, Hong S-E, Kim J-S, et al. Post-chemotherapy serum anti-Müllerian hormone level predicts ovarian function recovery. *Endocrine Connections*. août 2018;7(8):949-56.

88. Dunlop CE, Anderson RA. Uses of anti-Müllerian hormone (AMH) measurement before and after cancer treatment in women. *Maturitas*. mars 2015;80(3):245-50.
89. Chow EJ, Stratton KL, Leisenring WM, Oeffinger KC, Sklar CA, Donaldson SS, et al. Pregnancy after chemotherapy in male and female survivors of childhood cancer treated between 1970 and 1999: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *The Lancet Oncology*. mai 2016;17(5):567-76.
90. Nielsen SN, Andersen AN, Schmidt KT, Reznitzer C, Schmiegelow K, Bentzen JG, et al. A 10-year follow up of reproductive function in women treated for childhood cancer. *Reproductive BioMedicine Online*. août 2013;27(2):192-200.
91. Lambalk CB. Anti-Müllerian hormone, the holy grail for fertility counselling in the general population? *Human Reproduction*. oct 2015;30(10):2257-8.
92. van den Berg MH, Overbeek A, Lambalk CB, Kaspers GJL, Bresters D, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Long-term effects of childhood cancer treatment on hormonal and ultrasound markers of ovarian reserve. *Human Reproduction*. 1 août 2018;33(8):1474-88.
93. Anderson RA, Anckaert E, Bosch E, Dewailly D, Dunlop CE, Fehr D, et al. Prospective study into the value of the automated Elecsys antimüllerian hormone assay for the assessment of the ovarian growing follicle pool. *Fertility and Sterility*. avr 2015;103(4):1074-1080.e4.

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.

Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

L'HORMONE ANTI-MÜLLERIENNE:

Rôle, intérêt et comparaisons de techniques de dosages en PMA

L'hormone antimüllérienne (AMH), protéine sécrétée par les cellules de la granulosa, constitue un marqueur quantitatif de la réserve ovarienne. Vu son intérêt en clinique, l'hormone antimüllérienne est une analyse très prescrite par les médecins, surtout dans le service de procréation médicalement assistée (PMA). Le compte de follicules antraux (CFA) et le dosage d'AMH sont systématiquement évalués lors d'une consultation de préservation de la fertilité et dans le cadre du suivi de la fonction ovarienne.

Différents tests de dosage d'AMH existent, proposés par différentes techniques, mais actuellement nous n'en disposons pas dans notre laboratoire d'hormonologie au CHU de Bordeaux. L'internalisation de l'analyse pourrait raccourcir le délai de rendu du résultat. Selon nos objectifs, notre étude a permis de s'apercevoir des performances et de limites analytiques des techniques de dosage Biomerieux et Fujirébio, en comparant sur 50 échantillons les résultats d'AMH obtenues par ces techniques, à celle de Roche, dite de référence.

Dans notre étude, malgré une bonne concordance entre les trois techniques de dosage, on a remarqué encore une fois l'importance d'un standard international d'un point de vue diagnostique. Les conseils nationaux professionnels médicaux insistent fermement sur la nécessité de mettre en place un standard international afin de faciliter le développement de valeurs de référence, diminuer la variabilité inter-laboratoire et le coût dû aux dosages répétés ainsi que pour améliorer la sécurité des patients en évitant la mauvaise estimation des valeurs.

Mots-clés: AMH, hormone antimüllérienne, réserve ovarienne, procréation médicalement assistée, PMA, CFA, fertilité, hormonologie.

ANTI-MÜLLERIAN HORMONE:

Role, interest and comparison of assays methods in medically assisted procreation

Anti-müllerian hormone (AMH), a protein secreted by granulosa cells, is a quantitative marker of ovarian reserve. Due to its clinical value, the anti-müllerian hormone is a test highly prescribed by doctors, especially in the medically assisted procreation (MAP) department. The antral follicle count (AFC) and the result of the AMH test, are systematically evaluated during a fertility preservation consultation and also as part of the monitoring of ovarian function.

Different methods for the measurement of AMH level exist, but none of them is currently available in our hormonology laboratory at Bordeaux University Hospital. The introduction of one of these technical assays in our laboratory could shorten the delay of reaching the result. According to our objectives, our study made it possible to observe the performance and analytical limits of the Biomerieux and Fujirebio technology, by comparing it with Roche technology, known as the reference, by analysing 50 AMH samples, on each of them and evaluating the results.

In our study, despite a good agreement between the three assay methods, the importance of an international standard from a diagnostic point of view was once again noted. National medical commissions do strongly insist on the need of setting up an international standard in order to facilitate the development of reference values, decrease inter-laboratory variability and the cost due to repeated assays, as well as to improve patient safety by avoiding poor estimation of values.

Keywords: AMH, anti-müllerian hormone, ovarian reserve, medically assisted procreation, MAP, AFC, fertility, hormonology.