



Université
de Lille

Ecole doctorale Biologie – Santé

Thèse pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Spécialité du doctorat : Physiologie, Biologie des organismes,
populations, interactions

Domaine Scientifique : Biologie, médecine et santé

Rôle potentiel de l'hormone anti-müllérienne (AMH) et de ses différentes formes moléculaires, dans la physiopathologie et l'héritabilité du syndrome des ovaires polykystiques

Présentée et soutenue publiquement par

Maëliss PEIGNÉ

Le 2 décembre 2021,

devant le jury composé du :

| | | |
|---------------------------------|--|---------------------|
| Dr Isabelle BEAU | Directrice de Recherche, Kremlin-Bicêtre, France | Rapportrice |
| Pr Blandine COURBIERE | PU-PH, Université de Marseille, France | Rapportrice |
| Dr Paolo GIACOBINI | Directeur de Recherche, Lille, France | Examineur |
| Pr Michaël GRYNBERG | PU-PH, Université Paris Saclay, France | Examineur |
| Pr Sophie CATTEAU-JONARD | PU-PH, Université de Lille, France | Directrice de thèse |

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'équipe 2 « Développement et plasticité du
cerveau neuroendocrine » de l'UMR-S 1172 de l'Inserm

Université de Lille - CHU de Lille

Directeur d'unité : Monsieur le Docteur Luc Buée

Directeur d'équipe : Monsieur le Docteur Vincent Prévot

Sous la direction scientifique de

Monsieur le Docteur Paolo Giacobini,

Monsieur le Professeur Pascal Pigny

Et de Madame le Professeur Sophie Catteau-Jonard

Remerciements

Je tenais d'abord à remercier tous les membres de mon jury.

A Madame le Docteur **Isabelle Beau** et à Madame le Professeur **Blandine Courbière**, je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être les rapportrices. Vos domaines d'expertise respectifs permettront, j'en suis sûre, de faire émerger de nouvelles perspectives.

A Monsieur le Docteur **Paolo Giacobini**, je te remercie de m'avoir guidée pendant toutes ces années. Je suis admirative de ton énergie et de ta vivacité d'esprit. J'ai été honorée de pouvoir travailler à tes côtés et apprendre à ton contact. J'espère que nous aurons l'occasion, dans les années à venir, de pouvoir continuer à collaborer.

A Monsieur le Professeur **Michaël Grynberg**, je te remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse de science. Nos chemins se sont croisés il y a bien longtemps lors de mes premiers pas au labo à Clamart lorsque tu faisais ta thèse. Nous voilà maintenant dans le même service. Je suis honorée d'en faire partie et pouvoir apprendre à tes côtés à « sortir de ma zone de confort » pour toujours se remettre en question et avancer.

A Madame le Professeur **Sophie Catteau-Jonard**, je te remercie d'avoir dirigé cette thèse, comme tu avais dirigé la précédente, avec la même force tranquille qui te caractérise. Merci d'être toujours disponible, optimiste et de toujours croire en une issue possible, qui nous pousse à aller plus loin. J'admire ta facilité à concilier vie professionnelle et personnelle. Tu es un exemple pour moi.

Je tenais ensuite à remercier tous ceux qui ont aidé à l'aboutissement de ce travail.

Un merci tout particulier au Professeur **Pascal Pigny**, qui m'a épaulée à chaque étape de ce travail de thèse, dès les premiers essais de dosages de formes moléculaires de l'AMH. Je te remercie pour ton implication, ta disponibilité et ta rigueur dans le travail. Merci également pour toutes nos grandes discussions sur la vie hospitalo-universitaire en attendant que le DOC fasse son effet.

Tanks a lot to **Michael Pankhurst**, who first developed the method to measure molecular forms of AMH and helped me for validation experiments, enzymatic experiments, sent us some samples and participated actively to the first part of this work.

Nour, ma chère Nour, la lumière paraît-il, ce travail n'aurait pas pu exister sans toi, cela est certain également. Je n'ai pas de mot pour te remercier de toute l'aide et de tous les conseils que tu as pu m'apporter tout au long de ces cinq années de thèse. Merci également pour toutes tes qualités humaines, j'ai trouvé en toi une amie (verte) que j'espère garder longtemps.

La placenta's team ne serait pas la même sans toi **Virginie**. J'ai été ravie d'avoir pu te co-encadrer pour ton Master 2 mais bien au-delà je voulais te remercier pour ton implication dans ce travail et pour ta bonne humeur permanente. Merci également pour ton optimisme et ta persévérance, grâce à toi les inclusions HERITOPK sont terminées !

Un merci tout particulier à **Anne** pour ton aide pour les manips et pour les commandes, Thank a lot **Sam** especially for western blot lessons.

Merci à **Céline Méhats** et **Daniel Vaiman** pour m'avoir accueillie dans leur labo et m'avoir appris tous les secrets de la biopsie placentaire.

Merci à **Lydie** et **Sylvie** pour leur bonne humeur et toutes les prises de sang, Merci à **Christine** pour la recherche sans fin des archives du CHU de Lille mais toujours avec le sourire. Merci à toute l'équipe d'hormonologie du CBP de Lille et en particulier à **Isabelle** et **Mickaël** pour leur aide pour récupérer les prélèvements ou réaliser les dosages.

Merci enfin à **Dominique Luton** et **Sylvie Epelboin**, de m'avoir accordé dès le début le temps nécessaire pour pouvoir m'investir dans ce travail de recherche et poursuivre ce projet un peu fou.

Un grand merci également à toute l'équipe de recherche du centre Jean Pierre Aubert

Merci en particulier au Docteur **Vincent Prévost**, pour m'avoir accueillie dans ton laboratoire, avec son rayonnement international mérité. Je suis fière d'en faire partie.

Merci à tous les « copains de labo », d'où vous venez dans le monde, vous rendez cette équipe colorée, vivante et dynamique et c'est toujours une joie de vous rejoindre, ou de vous avoir connus : **Valerie, Monica, Sarah, Marion, Gaëtan, Mauro, Sara, Nadia, Sarah, Manon, Emilie, Mégane et tous les autres.**

Merci à **Anne- Laure** pour tous ces partages de bons plans et de galères tout au long du parcours de thèse et de MCU-PH. Je suis certaine que nous traverserons plein de nouvelles étapes ensemble et cela me réjouit.

Un merci particulier également à **Céline** qui fait un travail de gestion du laboratoire formidable et qui m'a été d'une aide précieuse à chaque problème rencontré. Enfin merci à **Thomas** pour le travail indispensable et attentionné que tu fais au sein du labo.

Je voudrais remercier tous ceux avec qui j'ai eu la chance de travailler ces dernières années

Il m'est impossible de ne pas remercier en premier lieu le Professeur **Didier Dewailly** qui m'a guidée tout au long de mon parcours d'interne puis de chef de clinique puis même encore par la suite. Votre expertise et votre curiosité permanente sont exemplaires. Vos conseils avisés sont précieux et je suis honorée d'avoir pu faire partie de vos élèves.

J'ai une pensée émue pour tous les membres des services de la région Nord qui ont forgés mon parcours d'interne puis de chef de clinique et en particulier à tous les membres du service d'AMP de Lille : **Sophie, Maryse, Christine, Patricia, Geoffroy, Catherine.** Merci pour tous vos précieux apprentissages qui resteront à jamais gravés et pour votre aide dans ce travail de thèse. Merci à toutes les membres des services d'AMP et de Biologie de la Reproduction de Lille.

Je remercie également tous les membres des services d'AMP et BDR de Bichat et en particulier **Sylvie, Solenne, Claire, Julien, Marie-Astrid et Xavier.** Merci pour tous nos échanges qui m'ont beaucoup appris. J'ai trouvé à Bichat une nouvelle famille après celle de Lille.

Merci à **toute l'équipe de Jean Verdier** de m'avoir fait une place parmi vous. Je suis ravie de poursuivre mon chemin à vos côtés et d'envisager l'avenir ensemble.

Enfin j'ai une pensée pour tous les GM que j'ai eu la chance de rencontrer dans mon parcours. En particulier **Geoffroy**, ta gentillesse et ta simplicité n'ont d'égal que tes connaissances et ta pédagogie, cela a été une chance d'être ton interne et un véritable honneur et plaisir de continuer à travailler ensemble ; **Charlotte**, sans toi je ne suis pas certaine d'avoir été là où je suis, ni certaine d'y rester, en tous cas je suis ravie de la sincérité, de la simplicité et pourtant de la richesse de nos échanges, j'espère que cela pourra continuer tout au long de nos carrières et vies respectives.

Enfin je voulais remercier mes proches

Merci à tous mes amis et famille d'être là, des soutiens indispensables et indéfectibles. Je mesure chaque jour la chance de vous avoir à mes côtés.

Même si je reste le Dr Peigné, je suis très fière d'être également Madame Morichau-Beauchant et très heureuse de faire partie d'une famille en plus.

Je tenais à remercier du fond du cœur toute la famille Peigné, si soudée, comme les moules à leur rocher dit-on, qui est une source de joie et de soutien permanente. Merci à **Maman**, pour tout, pour être toujours là pour moi, pour ma famille, pour ma thèse, merci pour tout ce que tu m'as apporté et pour la force que tu me donnes ; Merci à **Papa** de vouloir toujours le mieux pour nous, d'avoir toujours, malgré le temps, toujours peur pour nous, merci pour ton amour, nos discussions et nos partages ; Merci à **Alexis**, mon cher Oux, je ne pouvais rêver de meilleur frère.

Enfin je voulais remercier **Tristan, Gaspard et Diane**, pour le bonheur immense qu'ils m'apportent au quotidien. Vous êtes l'essentiel.

Résumé

CONTEXTE : Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), qui touche 5 à 20 % des femmes, est caractérisé par une hyperandrogénie, des troubles de l'ovulation ou un aspect échographique d'ovaires polykystiques. L'hormone anti-müllérienne (AMH), dont le taux sérique est 2-3 fois plus élevé chez les femmes avec SOPK que chez les témoins, a pour rôle l'inhibition du recrutement folliculaire initial et cyclique et pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de ce syndrome. Elle existe sous différentes formes moléculaires, clivée et non-clivée. L'injection d'AMH chez la souris en fin de gestation provoque, dans la descendance, l'apparition d'un phénotype « SOPK » possiblement via une hyperandrogénie gestationnelle. L'AMH pourrait donc, également, jouer un rôle dans l'héritabilité du SOPK qui est estimée entre 35 et 70%, mais n'est expliquée que dans moins de 10% des cas par une cause génétique.

PARTIE 1 : Dans la première partie, nous nous sommes intéressés à la proportion des différentes formes moléculaires de l'AMH dans le sérum et dans le liquide folliculaire des femmes en fonction de la présence ou non d'un SOPK et de l'indice de masse corporelle. Après un prétraitement de l'échantillon par déoxycholate (DOC), seule la forme non-clivée, inactive, de l'AMH était dosable. Ainsi, par comparaison des mesures d'AMH avec ou sans prétraitement par DOC, nous avons obtenu la proportion des formes moléculaires clivées et non-clivées de l'AMH. Cette proportion n'est pas différente entre les femmes atteintes d'un SOPK et les femmes témoins. En revanche, la proportion de formes clivées est plus élevée dans le sérum de femmes obèses par rapport aux femmes de poids normal, alors qu'elle n'est pas différente dans le liquide folliculaire. Ainsi, nous avons pu montrer que le clivage de la forme inactive de l'AMH, en sa forme clivée active, semble survenir plutôt en dehors de l'ovaire et est majoré chez les patientes obèses.

PARTIE 2 : Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons exploré, chez la femme, l'impact possible de l'AMH pendant la grossesse sur l'héritabilité du SOPK. Nous avons réalisé un suivi longitudinal trimestriel de femmes enceintes porteuses ou non d'un SOPK. Nous avons mis en évidence que le taux d'AMH, et de sa forme clivée, diminuaient significativement pendant la grossesse mais restaient plus élevés chez les femmes avec SOPK que chez les témoins. En revanche la proportion de ces différentes formes moléculaires n'était pas modifiée pendant la grossesse. Une hyperandrogénie gestationnelle est retrouvée chez les femmes avec SOPK mais nécessite d'être confirmée par des dosages complémentaires. A la différence de ce qui a été montré chez la souris, le taux de LH chez les femmes avec SOPK n'est pas plus élevé que chez

les témoins en fin de grossesse. Enfin, les analyses d'expressions géniques placentaires ne sont que parcellaires mais l'expression des gènes de la stéroïdogénèse et de l'AMHR2 est bien retrouvée, sans différence significative entre femmes avec SOPK et femmes témoins, pour le moment.

CONCLUSION : Ce travail a permis de mettre en évidence que le lien entre AMH et SOPK, cette pathologie hétérogène, est complexe. L'AMH, par la modulation de ses formes actives circulantes en fonction de l'environnement métabolique, pourrait avoir des impacts différents selon les phénotypes métaboliques des patientes. En particulier pendant la grossesse, l'AMH pourrait participer, peut-être de façon différente en fonction des phénotypes métaboliques des patientes, à moduler un état d'hyperandrogénie gestationnelle possiblement à l'origine de modifications d'expressions géniques ou épigénétiques pendant le développement fœtal à l'origine d'une prédisposition au développement ultérieur du SOPK.

Titre et résumé en anglais

Potential role of the anti-Müllerian hormone and its different molecular forms, in pathophysiology and heritability of polycystic ovary syndrome.

BACKGROUND: Polycystic ovary syndrome (PCOS), which affects 5-20% of women, is characterized by hyperandrogenism, ovulation disorders and/or appearance of polycystic ovaries. Anti-Müllerian hormone (AMH), the serum level of which is 2-3 times higher in women with PCOS than in controls, inhibits initial and cyclic follicular recruitment and may play a role in the pathophysiology of this syndrome. It exists in different molecular forms, cleaved and un-cleaved. Injection of AMH in late gestational mice causes the development of a "PCOS" phenotype in the offspring's, possibly via gestational hyperandrogenism. AMH could therefore also play a role in the heritability of PCOS which is estimated between 35 and 70% but is only explained in less than 10% of cases by a genetic cause.

PART 1: In the first part of this work, we focused on the proportion of the different molecular forms of AMH in the serum and in the follicular fluid of women according to the presence or not of PCOS and according to the body mass index. After pre-treatment of the sample with deoxycholate (DOC), only the un-cleaved (inactive) form of AMH was measurable. Thus, by comparison of AMH measurements with or without DOC pretreatment, we obtained the proportion of cleaved and un-cleaved molecular forms of AMH. This proportion is not different between women with PCOS and controls. In contrast, the proportion of cleaved forms is higher in the serum of obese women compared to women of normal weight, while it is not different in the follicular fluid. We were thus able to show that the cleavage of the inactive form of AMH into the cleaved isoform is likely to occur in extra-ovarian tissues and to be exacerbated in obese individuals.

PART 2: In the second part of this work, we explored the possible impact of AMH on the heritability of PCOS in women during pregnancy. We carried out a quarterly longitudinal follow-up of pregnant women with or without PCOS. We found that AMH, and its cleaved form, decreased significantly during pregnancy but remained higher in women with PCOS than in control women. However, the proportion of these different molecular forms did not change during pregnancy. Gestational hyperandrogenism is found in women with PCOS but needs to be confirmed by additional assays. Unlike what has been shown in mice, the LH in women with

PCOS is not higher than in control women in late pregnancy. Finally, the analyzes of placental gene expression are only partial, but the expression of the genes for steroidogenesis and AMHR2 is found, without significant difference between women with PCOS and controls, up to now.

CONCLUSION: This work has shown that the link between AMH and PCOS, this heterogeneous pathology, is complex. AMH, by modulating its circulating active forms according to the metabolic environment, could have different impacts depending on the metabolic phenotypes of patients. Particularly during pregnancy, AMH could participate, perhaps in a different way depending on the metabolic phenotypes of the patients, in modulating a state of gestational hyperandrogenism possibly at the origin of gene expression or epigenetic changes during fetal development causing a predisposition to the further development of PCOS.

Mots Clés

SOPK ; AMH ; grossesse ; AMH clivée ; formes moléculaires ; placenta ; IMC

Keywords

PCOS; AMH; pregnancy; cleaved AMH; molecular forms; placenta; BMI

Table des matières

| | |
|--|----|
| Remerciements..... | 5 |
| Résumé..... | 9 |
| Titre et résumé en anglais | 11 |
| Mots Clés..... | 13 |
| Table des illustrations | 17 |
| Liste des abréviations..... | 21 |
| INTRODUCTION | 23 |
| ETAT DES CONNAISSANCES..... | 25 |
| I – L’Hormone Anti-Müllerienne (AMH) | 25 |
| a/ Historique | 25 |
| b/ Gène de l’AMH..... | 26 |
| c/ Protéine et formes moléculaires de l’AMH..... | 26 |
| d/ Expression et sécrétion de l’AMH dans l’ovaire | 29 |
| e/ Récepteur et voies de signalisation de l’AMH | 31 |
| f/ Rôle gonadique de l’AMH chez la femelle et la femme..... | 33 |
| g/ Effets extra-gonadiques de l’AMH | 37 |
| h/ L’AMH en pratique clinique | 40 |
| i/ Le dosage d’AMH sérique et ses limites..... | 42 |
| II - Le Syndrome des ovaires polykystiques (SOPK)..... | 46 |
| a/ Historique, épidémiologie et bases physiopathologiques..... | 46 |
| b/ Définition et présentations cliniques | 46 |
| c/ Syndrome métabolique, insulino-résistance et SOPK | 48 |
| d/ Complications à court, moyen et long terme du SOPK | 50 |
| e/ Hormone anti-Müllerienne et SOPK..... | 52 |
| f/ Hypothèses physiopathologiques du SOPK..... | 55 |
| g/ Héritabilité du SOPK et hypothèses physiopathologiques..... | 61 |

| | |
|---|-----|
| h/ Stéroïdogénèse placentaire chez les femmes avec SOPK et place de l'AMH.. | 68 |
| HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL..... | 71 |
| PARTIE 1 : LES FORMES MOLECULAIRES DE L'AMH, UNE PROPORTION | |
| DIFFERENTE SELON LES STATUTS SOPK OU METABOLIQUE ?..... | 75 |
| Mise en contexte | 77 |
| Résumé en français | 77 |
| Article | 79 |
| PARTIE 2 : L'AMH ET SES FORMES MOLECULAIRES PENDANT LA GROSSESSE, | |
| POSSIBLES ELEMENTS PARTICIPANTS A L'HERITABILITE DU SOPK | 113 |
| Introduction | 115 |
| Matériel et Méthodes | 119 |
| Résultats..... | 129 |
| Discussion..... | 151 |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES | 159 |
| REFERENCES | 167 |
| ANNEXES..... | 189 |
| Annexe 1 : Publications en lien avec le travail de thèse par ordre chronologique..... | 189 |
| Annexe 2 : Communication écrite en lien avec le travail de thèse : Poster ESHRE 2018. | 193 |
| Annexe 3 : Comité de Protection des Personnes complet pour l'étude HERITOPK..... | 194 |
| Annexe 4 : Lettre d'information des patientes pour l'étude HERITOPK | 196 |
| Annexe 5 : Consentement pour l'étude HERITOPK..... | 199 |

Table des illustrations

Introduction

Figures

| | | |
|-------------|--|----|
| Figure 1 : | Les différentes formes moléculaires de l'AMH..... | 24 |
| Figure 2 : | Suivi des taux d'AMH sérique au cours de la vie des femmes..... | 27 |
| Figure 3 : | Voie de signalisation principale de l'AMH..... | 29 |
| Figure 4 : | Schéma de la folliculogénèse..... | 30 |
| Figure 5 : | Rôle de l'AMH sur la croissance folliculaire..... | 32 |
| Figure 6 : | Rationnel pour utiliser l'AMH comme marqueur de la réserve folliculaire ovarienne..... | 37 |
| Figure 7 : | Exemple de fixation des anticorps pour le dosage d'AMH par technique ELISA..... | 40 |
| Figure 8 : | Les quatre phénotypes de SOPK..... | 44 |
| Figure 9 : | Liens entre phénotypes du SOPK et troubles métaboliques..... | 46 |
| Figure 10 : | Les différentes complications liées au SOPK tout au long de la vie d'une femme..... | 48 |
| Figure 11 : | Liens entre FSH, œstradiol et AMH au cours de la folliculogénèse entre femmes avec SOPK et femmes normo-ovulantes..... | 55 |
| Figure 12 : | Effet hypothalamique de l'AMH chez les femmes normales (NORMAL) ou atteintes d'un SOPK (PCOS)..... | 57 |
| Figure 13 : | Hypothèses physiopathologies impliquant l'AMH dans l'héritabilité du SOPK..... | 62 |
| Figure 14 : | Transmission épigénétique transgénérationnelle du SOPK..... | 63 |
| Figure 15 : | Stéroïdogénèse de l'unité fœto-placentaire..... | 66 |

Tables

| | | |
|-----------|--|----|
| Table 1 : | Caractéristiques des différents dosages d'AMH..... | 42 |
|-----------|--|----|

Partie 1

Figures

| | | |
|---------------|---|----|
| Sup Figure 1: | Specific assay for proAMH measurement..... | 80 |
| Sup Figure 2: | DOC pretreatment dissociates AMH _{N,C} | 83 |

| | | |
|------------|--|----|
| Figure 1 : | AMH molecular forms in the early follicular phase (EFP) serum: women with polycystic ovary syndrome (PCOS) versus controls split by body mass index (BMI)..... | 87 |
| Figure 2 : | Correlation of AMH prohormone index (API) in the early follicular phase serum with metabolic parameters..... | 89 |
| Figure 3 : | Proportion of AMH molecular forms in the follicular fluid and in the end of ovarian stimulation serum: normal weight versus obese women... | 91 |

Tables

| | | |
|---------------|--|----|
| Sup Table 1 : | Low limits of quantification and intra-/ inter-assay variation of analytes.. | 78 |
| Sup Table 2: | AMHC Cross-reactivity test in AMH Dxi automatic analyzer (Beckman-Coulter)..... | 80 |
| Sup Table 3: | ProAMH is insensitive to DOC treatment..... | 83 |
| Table 1 : | Population characteristics in the early follicular phase serum study..... | 85 |
| Sup Table 4 : | p values for intergroup comparisons of patient's characteristics | 85 |
| Sup Table 5 : | AMH molecular forms in the early follicular phase (EFP) serum: women with polycystic ovary syndrome (PCOS) versus controls split by body mass index (BMI)..... | 86 |
| Table 2 : | Correlation of proAMH ratio in the serum and follicular fluid with clinical, hormonal, ultrasonographic, and metabolic parameters | 88 |
| Sup Table 6 : | Population characteristics at the end of ovarian stimulation study..... | 90 |
| Sup Table 7 : | Proportion of AMH molecular forms in the follicular fluid (FF) and in the end of ovarian stimulation serum (ES Serum): normal weight versus obese women..... | 92 |

Partie 2

Figures

| | | |
|------------|---|-----|
| Figure 1 : | Schéma du déroulement de la recherche..... | 112 |
| Figure 2 : | Schéma des différents traitements des biopsies placentaires..... | 114 |
| Figure 3 : | Schéma de répartition des patientes à inclure et principales étapes de suivi..... | 117 |
| Figure 4 : | Flow chart des inclusions au 15 septembre 2021..... | 120 |
| Figure 5 : | AMH totale sérique (pmol/L) avant et au cours de la grossesse chez les patientes avec SOPK et les témoins | 125 |

| | | |
|-------------|---|-----|
| Figure 6 : | AMH clivé (pmol/L) avant et au cours de la grossesse chez les patientes avec SOPK et les témoins..... | 126 |
| Figure 7 : | Index de ProAMH (IPA) (%) avant et au cours de la grossesse chez les patientes avec SOPK et les témoins | 127 |
| Figure 8 : | Taux de LH sérique (UI/L) avant et au cours de la grossesse chez les patientes avec SOPK et les témoins..... | 128 |
| Figure 9 : | Taux d'œstradiol (E2) sérique (pg/ml) avant et au cours de la grossesse chez les patientes avec SOPK et les témoins..... | 129 |
| Figure 10 : | Taux de testostérone totale sérique (ng/ml) avant et au cours de la grossesse chez les patientes avec SOPK et les témoins | 130 |
| Figure 11 : | AMH totale sérique (pmol/L) avant et au cours de la grossesse chez les patientes Obèses/en surpoids ou de poids normal avant la grossesse..... | 135 |
| Figure 12 : | AMH totale sérique (pmol/L) avant et au cours de la grossesse chez les patientes de poids normal avant la grossesse ou obèses/en surpoids, avec SOPK ou témoins | 137 |
| Figure 13 : | Expression placentaire des gènes des enzymes de la stéroïdogenèse et de l'AMHR2..... | 140 |

Tables

| | | |
|-----------|---|-----|
| Table 1 : | Séquences des amorces TaqMan® utilisées pour la Q-PCR..... | 115 |
| Table 2 : | Descriptif des populations SOPK et témoin avant la grossesse..... | 121 |
| Table 3 : | Descriptif et suivi des populations SOPK et témoin pendant la grossesse..... | 122 |
| Table 4 : | Descriptif de la population avant la grossesse obèse/en surpoids ou de poids normal..... | 132 |
| Table 5 : | Descriptif et suivi des patientes obèses/en surpoids et de poids normal au cours de la grossesse..... | 133 |

Conclusion et perspectives

| | | |
|----------|--|-----|
| Figure : | Hypothèse physiopathologique de l'impact de l'AMH et de l'insuline chez les patientes avec SOPK en fonction de l'IMC et du terme de la grossesse sur l'hyperandrogénie gestationnelle et la reprogrammation fœtale in utero..... | 151 |
|----------|--|-----|

Liste des abréviations

| | |
|----------------------|---|
| 5 α DHT : | 5 α -Dihydrotestosterone |
| ACVR : | Activin A receptor |
| ALK : | Activin receptor-like kinases – (product of ACVR1) |
| AMH : | Anti-Müllerian Hormone - Hormone Anti-Müllerienne |
| AMH _{N,C} : | Association non covalente des fragments N- et C-terminaux de l'AMH |
| AMHR2 : | Récepteur de type 2 de l'AMH |
| AMP : | Assistance Médicale à la Procréation |
| API : | AMH Pro Index = (proAMH/AMH totale) X 100 |
| AR : | Androgen Receptor = récepteur aux androgènes |
| ARNm : | Acide RiboNucléique messenger |
| ASRM : | American Society of Reproductive Medicine |
| β HSD : | β Hydroxy-Stéroïde Déshydrogenase |
| BMI : | Body Mass Index |
| BMP : | Bone Morphogenetic Proteins |
| BMPR : | Bone Morphogenetic Proteins Receptor |
| CYP : | Cytochrome (P= n°de sa famille) |
| DHEA : | DéHydroEpi Androstérone |
| DOC : | Deoxycholate |
| DSL : | Diagnostic System Lab (DSL - Etats-Unis) |
| EIA – AMH/MIS : | Anticorps monoclonal pour tests de type ELISA ultra-sensibles pour dosage de l'AMH (Europe) |
| ESHRE : | European Society of Human Reproduction and Embryology |
| FIV : | Fécondation <i>in vitro</i> |
| FSH : | Folliculin Stimulating Hormone |
| GDF : | Growth Differentiation Factors |
| GnRH : | Gonadotropin-Releasing Hormone |
| HSD : | Hydroxy-Stéroïde Déshydrogénase |
| IGF : | Insulin-Like Growth Factor |
| IGRBP : | Insulin-like Growth Factor Binding Protein |
| IMC : | Indice de Masse Corporelle |
| IPA : | Index de ProAMH = API |
| LH : | Luteinizing Hormone |
| LHCGR : | Luteinizing Hormone/Chorio-Gonadotropin Receptor |
| MIS : | Müllerian Inhibiting Substance |
| NICE : | National Institute for Care Excellence - Institut National pour l'Excellence de la santé et du soin |

| | |
|--------------|---|
| NFκB : | Nuclear Factor-kappa B |
| PBS buffer : | Phosphate-Buffered Saline (tampon) |
| PCOS : | PolyCystic Ovary Syndrome |
| PCSK : | Proprotéine Convertase Subtilisine/Kexine |
| POSEIDON: | Patient Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number |
| proAMH : | Précurseur de l'AMH, inactive |
| qRT-PCR : | Real-Time Quantitative Reverse Transcription - Polymérase Chain Reaction |
| SCC : | Side- Chain Cleavage enzyme = Cyp11a |
| SDHA : | Succinate dehydrogenase complex sous unité A |
| SDHEA : | Sulfate de Déhydroépiandrostérone |
| SHBG : | Sex Hormone-Binding Globulin |
| SMADx : | Mothers against decapentaplegic homolog x |
| SOPK : | Syndrome des ovaires polykystiques |
| StAR : | Steroidogenic acute regulatory protein |
| SYBR : | Composé organique aromatique de la famille des cyanines asymétriques se liant aux acides nucléiques |
| TGFβ : | Transforming growth factor β |

INTRODUCTION

ETAT DES CONNAISSANCES

I – L’Hormone Anti-Müllerienne (AMH)

L’hormone anti-müllerienne, ou AMH, doit son nom à sa première fonction découverte dans la différenciation sexuelle mâle : la régression des canaux de Müller. Ces canaux de Müller sont les éléments embryonnaires primitifs à l’origine de la formation de l’appareil génital féminin ; ils donneront ainsi, au cours de l’organogénèse, l’utérus, les trompes et les deux tiers supérieurs du vagin. Chez les mâles, ce sont les canaux de Wolff qui vont se développer pour former l’appareil génital masculin interne, tandis que vont régresser les canaux de Müller.

a/ Historique

Nous devons ainsi la découverte de l’hormone anti-Müllerienne (AMH) ou substance inhibitrice des canaux de Müller (MIS) aux travaux d’Alfred Jost dans les années 50. Il fut le premier à suspecter l’existence d’un élément spécifique de la différenciation sexuelle mâle qui permettait la régression des canaux de Müller pendant la vie embryonnaire (Jost, 1947). Il castra des fœtus de lapin et observa, qu’en l’absence de testicules, les canaux de Müller se transformaient en organes génitaux internes femelles et que les canaux de Wolff disparaissaient. Il greffa ensuite un cristal de testostérone ou un fragment de testicule fœtal à côté d’ovaires fœtaux de lapines. Tous deux permirent le développement des dérivés Wolffiens mais seul le fragment testiculaire eut pour conséquence la régression des canaux de Müller. Ainsi, un « inhibiteur des canaux de Müller » renommé ensuite MIS (Müllerian Inhibiting Substance) puis AMH (Anti-Müllerian Hormone) fut décrit comme étant responsable de la différenciation sexuelle mâle pendant la vie intra-utérine.

Il fallut attendre 1984 et les travaux de Vigier et collaborateurs pour savoir que cette hormone est aussi synthétisée chez les femelles, après la naissance, par les cellules de la granulosa (Vigier *et al.*, 1984).

b/ Gène de l'AMH

Le gène de l'AMH a été cloné en 1986 chez le bovin (Picard *et al.*, 1986) et chez l'Homme (Cate *et al.*, 1986). Il est localisé sur le bras court du chromosome 19 (19p13.3), mesure 2,8kb et comprend 5 exons. Le cinquième exon code pour le domaine mature C-terminal de l'AMH, portion bioactive de l'hormone. La séquence de ce gène est extrêmement bien conservée tout au long de l'évolution, surtout pour les exons 2-5, et a été décrite dans de nombreuses espèces : mammifères (Münsterberg and Lovell-Badge, 1991; Haqq *et al.*, 1992; Lahbib-Mansais *et al.*, 1997), gallinacés (Oreal *et al.*, 1998), reptiles (Western *et al.*, 1999), marsupiaux (Pask *et al.*, 2004), Zebra Fish (Schulz *et al.*, 2007) et amphibiens (Al-Asaad *et al.*, 2013).

Le gène humain, au contraire de ce qui se passe chez le bovin, le rat ou la souris, a différents sites d'initiation de transcription (di Clemente *et al.*, 2021). Dans le testicule fœtal et dans l'ovaire humain, le site majeur d'initiation de transcription (10 pdb avant le codon ATG), représente 88% des transcrits (di Clemente *et al.*, 2021).

c/ Protéine et formes moléculaires de l'AMH

La protéine AMH a été purifiée pour la première fois en 1984 par immunochromatographie à partir de milieux d'incubation de testicules de veaux (Picard and Josso, 1984). Elle est synthétisée dans l'espèce humaine sous la forme initiale d'une protéine (pré-pro-hormone) de 566 acides aminés. La perte des 24 premiers acides aminés, correspondant probablement au peptide signal, laisse place à une glycoprotéine homo-dimérique de 140 kDa constituée de deux sous-unités de 70kDa reliées par des ponts disulfure (= proAMH) (**Figure 1**).

L'AMH fait partie de la super famille du Transforming Growth Factor β (TGF β) qui comprend, entre autres, les inhibines, les activines, les Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) et les Growth Differentiation Factors (GDF), et régule de nombreuses fonctions de prolifération et de différenciation cellulaire. Le domaine C-terminal de 149 acides aminés comporte environ 30% d'homologie avec le TGF β , alors que la portion N-terminale a le moins d'homologie entre espèces et avec les autres membres de la famille du TGF β (di Clemente *et al.*, 2021).

La proAMH doit ensuite subir une protéolyse au niveau de sites monobasiques entre les acides aminés Arginine 427 et Sérine 428 pour devenir biologiquement active (Pepinsky *et al.*, 1988; di Clemente *et al.*, 2010). Le clivage va donner naissance à un homodimère N-terminal de 110kDa (association de deux dimères similaires de 57 kDa, l'AMH_N) n'ayant pas d'activité intrinsèque et à un homodimère C-terminal de 25 kDa (association de deux sous-unités identiques de 12,5 kDa, l'AMH_C). Seul le fragment C-terminal de l'AMH est actif et peut se lier au récepteur spécifique de l'AMH : l'AMHR2, pour l'activer. Ces deux homodimères N- et C-terminaux restent associés de façon non covalente et forment l'AMH_{N,C} (McLennan and Pankhurst, 2015) (**Figure 1**).

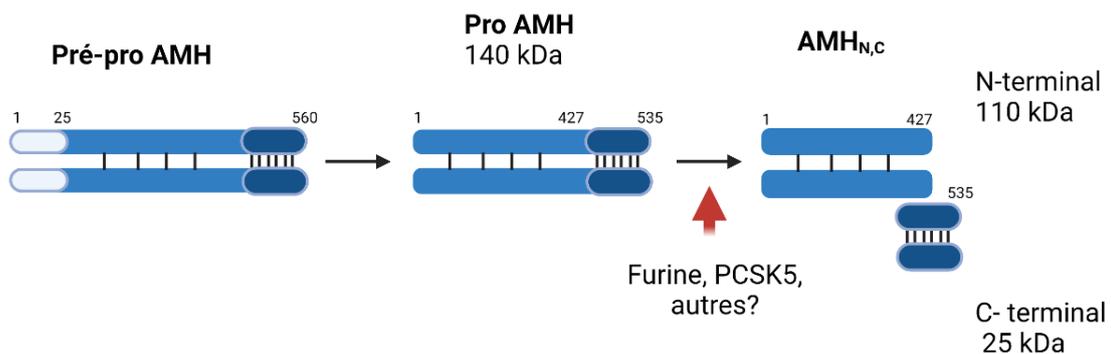


Figure 1 : Les différentes formes moléculaires de l'AMH. L'AMH est synthétisée sous la forme d'une pré-pro hormone de 560 acides aminés. La perte des 24 premiers acides aminés, correspondant probablement au peptide signal, laisse place à une glycoprotéine homo-dimérique de 140 kDa constituée de deux sous-unités de 70kDa reliées par des ponts disulfure (= proAMH). La proAMH va ensuite subir une protéolyse au niveau de sites monobasiques entre les acides aminés Arginine 427 et Serine 428, peut-être sous l'action de la furine ou de la Protéine convertase 5 (PCSK5). Le clivage va donner naissance à un homodimère N-terminal de 110kDa (association de deux dimères similaires de 57 kDa, l'AMH_N) n'ayant pas d'activité intrinsèque et à un homodimère C-terminal de 25 kDa (association de deux sous-unités identiques de 12,5 kDa, l'AMH_C). Seul le fragment C-terminal de l'AMH est actif et peut se lier au récepteur spécifique de l'AMH : l'AMHR2, pour l'activer. Ces deux homodimères N- et C- terminaux restent associés de façon non covalente et forment l'AMH_{N,C}. Créé avec BioRender.com.

Bien que n'ayant pas d'activité biologique intrinsèque, le fragment N-terminal, lorsqu'il est associé de façon non covalente au fragment C-terminal (=AMH_{N,C}), semble stabiliser ce dernier et augmenter son activité biologique (Wilson *et al.*, 1993). Plusieurs formes moléculaires d'AMH co-existent donc : une forme non clivée inactive (proAMH) et des formes clivées, biologiquement actives, AMH_{N,C} et AMH_C (fragment C-terminal) (Pankhurst and McLennan, 2013). Dans le sérum peuvent être détectées la proAMH et l'AMH_{N,C} (Pankhurst and McLennan, 2013; McLennan and Pankhurst, 2015). La présence du fragment C-terminal seul dans le sérum n'est pas démontrée mais semble peu probable au vu de son extrême instabilité en l'absence d'association au fragment N-terminal (Wilson *et al.*, 1993; Pankhurst and McLennan, 2013). Ceci suggère que la forme clivée AMH_{N,C} semble être la seule isoforme circulante « bioactive », pouvant se lier au récepteur, pour exercer une fonction hormonale dans les différents tissus exprimant l'AMHR2. Dans le liquide folliculaire chez la vache, la forme prédominante est la proAMH, suggérant que l'AMH peut être synthétisée et libérée avec peu ou pas de clivage antérieur (Campbell *et al.*, 2012).

Le ratio de chaque forme moléculaire de l'AMH dans le sérum est différent en fonction de la population considérée : filles, garçons, femmes, hommes, femmes enceintes... (McLennan and Pankhurst, 2015; Pankhurst *et al.*, 2016a, 2016b). Cette observation pourrait aller dans le sens d'une action différente de l'hormone en fonction de la population. Ainsi, la proAMH est plus abondante dans le sérum chez le petit garçon et chez la petite fille tandis que l'AMH_{N,C} est la forme prédominante chez l'homme et la femme adulte (Pankhurst *et al.*, 2016a).

Les enzymes permettant le clivage de la proAMH ne sont pas encore bien connues. Les pro-protéines convertases subtilin/kexin-like semblent être de bons candidats. La furine (PCSK3) et la PCSK5 pourraient provoquer le clivage de l'AMH (Nachtigal and Ingraham, 1996). En effet, la PCSK5 est capable de cliver l'AMH après co-transfection dans des cellules de testicules fœtaux de rats (Nachtigal and Ingraham, 1996). La furine (PCSK3) est capable *in vitro* d'engendrer le clivage de l'AMH (Nachtigal and Ingraham, 1996; Pankhurst and McLennan, 2016). La plasmine pourrait également être un bon candidat comme enzyme de clivage de l'AMH car, *in vitro*, elle peut cliver la proAMH (Pepinsky *et al.*, 1988; Mamsen *et al.*, 2015). Ces enzymes sont exprimées dans un très grand nombre de cellules, en particulier dans les vaisseaux (McLennan and Pankhurst, 2015) et les neurones (Cain *et al.*, 2003; Barbotin *et al.*, 2019). De plus, les taux sériques de furine sont modulés selon le statut inflammatoire, comme rencontré dans les pathologies métaboliques ou cardio-vasculaires (Fathy *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2017). Cependant, les enzymes responsables *in vivo* du clivage de la proAMH restent

largement inconnues et toute la proAMH produite au niveau des cellules de la granulosa n'est pas clivée puisque la proAMH et l'AMH_{N,C} sont présentes dans le sérum et dans le liquide folliculaire des femmes (Pankhurst and McLennan, 2013; Pierre *et al.*, 2016). De plus, *in vitro*, d'autres variants de clivage de l'AMH ont été décrits (clivage entre acides aminés 194 et 195 ou 254 et 255) mais non retrouvés dans le sérum de façon physiologique (McLennan and Pankhurst, 2015). Enfin, le site anatomique du clivage de la proAMH reste à déterminer. Il pourrait survenir dans différents tissus (cellules de la granulosa ? liquide folliculaire ? vaisseaux ? tissu cible ?) et être possiblement influencé par le statut métabolique de l'individu, mais ceci reste à explorer.

Une autre inconnue demeure : l'effet différentiel possible de l'AMH en fonction des différentes voies de signalisation activées (détaillé ci-après).

d/ Expression et sécrétion de l'AMH dans l'ovaire

L'AMH est exprimée et sécrétée, chez la femme, par les cellules de la granulosa au sein des follicules ovariens mais son expression dépend du stade folliculaire. L'AMH est détectable dans le sang de cordon d'un fœtus féminin dès 21 semaines de grossesse (Vanky and Carlsen, 2012). Son taux croît ensuite jusqu'à l'âge de 25 ans environ puis décroît progressivement, et de façon plus prononcée à partir de 38 ans, pour devenir indétectable à la ménopause (Kelsey *et al.*, 2011) (**Figure 2**).

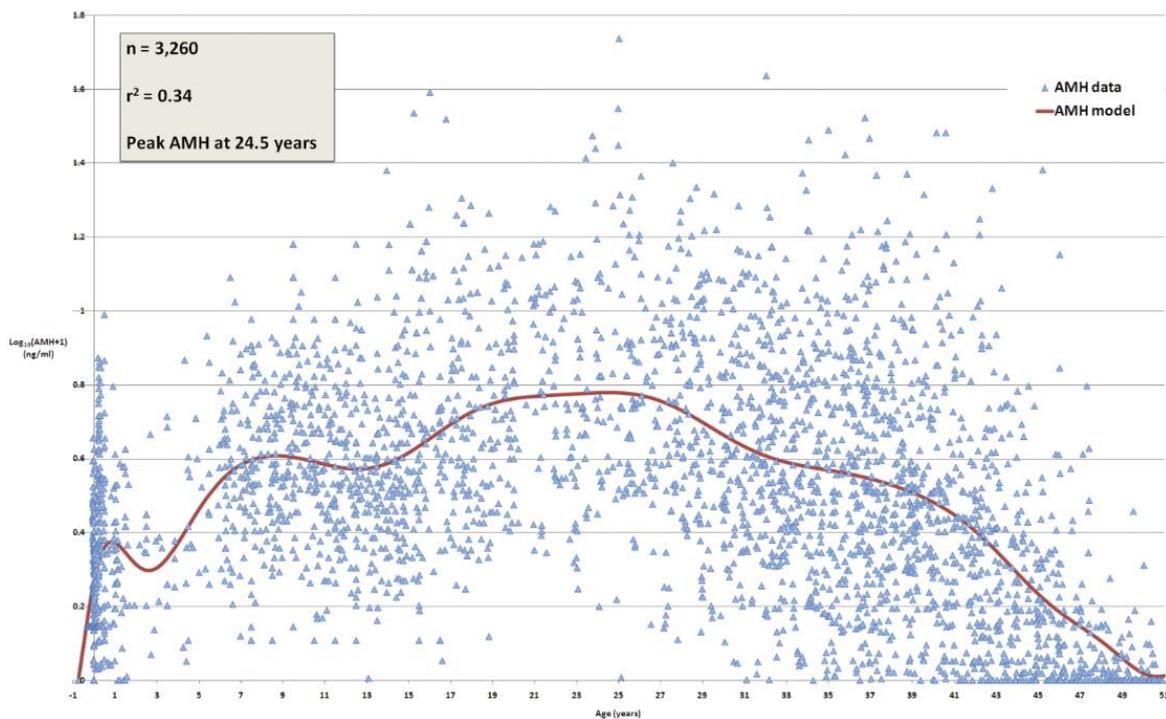


Figure 2 : Suivi des taux d'AMH sériques au cours de la vie des femmes. Dans ce modèle la ligne rouge est le meilleur modèle correspondant aux 3260 points de dosages représentés par les triangles. Le coefficient de détermination est à 0,34, indiquant que 34% de la variation des concentration sérique d'AMH est due à l'âge uniquement. La sécrétion d'AMH commence en fin de vie intra-utérine, augmente progressivement jusqu'à l'âge de 24,5 ans puis décroît progressivement, et de façon plus rapide après l'âge de 38 ans, pour devenir indosable après la ménopause (Kelsey *et al.*, 2011).

L'expression de l'AMH par les cellules de la granulosa commence dès le stade de follicule primaire. Elle est maximale dans les follicules pré-antraux et petits follicules antraux jusqu'au stade de sélection pour la dominance : entre 4 à 6 mm de diamètre dans l'espèce humaine (Visser and Themmen, 2005). L'AMH devient ensuite presque indétectable dans les follicules humains de plus de 8 mm et n'est plus exprimée dans les follicules atrophiques et les corps jaunes (Bézar *et al.*, 1987; Baarends *et al.*, 1995; Weenen *et al.*, 2004). Il est à noter que, dans les larges follicules antraux, les cellules du cumulus et celles près de la cavité antrale expriment toujours l'ARNm de l'AMH (Baarends *et al.*, 1995; Weenen *et al.*, 2004; Grøndahl *et al.*, 2011; Kedem-Dickman *et al.*, 2012) et secrètent la protéine AMH (Bézar *et al.*, 1987).

L'AMH est également exprimée par d'autres tissus reproductifs comme l'hypothalamus (Cimino *et al.*, 2016) et les cellules gonadotropes de l'anté-hypophyse (Garrel *et al.*, 2016) pouvant participer à des effets paracrines ou autocrines.

Cependant le taux d'AMH sérique, à l'origine de l'action endocrine de l'AMH, est dépendant, principalement, de la production ovarienne puisque son taux devient indétectable après la ménopause (Kelsey *et al.*, 2011) ou rapidement après une ovariectomie bilatérale (Griesinger *et al.*, 2012).

e/ Récepteur et voies de signalisation de l'AMH

Comme les autres membres de la famille du TGF- β , l'AMH agit via deux types de récepteurs: les récepteurs de type 1, qu'elle partage avec les BMPs (ALK2/ACVR1, ALK3/BMPR1A, ALK6/BMPR1B) et un récepteur de type 2 qui lui est spécifique (AMHR2) (Josso and Clemente, 2003; Visser and Themmen, 2005; di Clemente *et al.*, 2021), aucun autre ligand ne pouvant se lier à lui (Mishina *et al.*, 1996) (**Figure 3**).

L'AMHR2 est un récepteur transmembranaire à activité sérine/thréonine kinase (Josso and Clemente, 2003). La portion C-terminale de l'AMH, après sa dissociation du complexe AMH_{N,C}, en se fixant sur l'AMHR2, permet la dimérisation de l'AMHR2 puis le recrutement et l'activation d'un des récepteurs de type 1. Le complexe des récepteurs 1 et 2 provoque la phosphorylation de protéines SMAD 1, 5 ou 8, la formation d'un complexe avec une co-smad (SMAD 4 : commune aux voies BMP-TGF), la translocation du complexe au noyau et la régulation directe ou indirecte de l'expression de gènes cibles (di Clemente *et al.*, 2021). Cette voie de signalisation est régulée négativement par une SMAD inhibitrice : la SMAD 6 (di Clemente *et al.*, 2021).

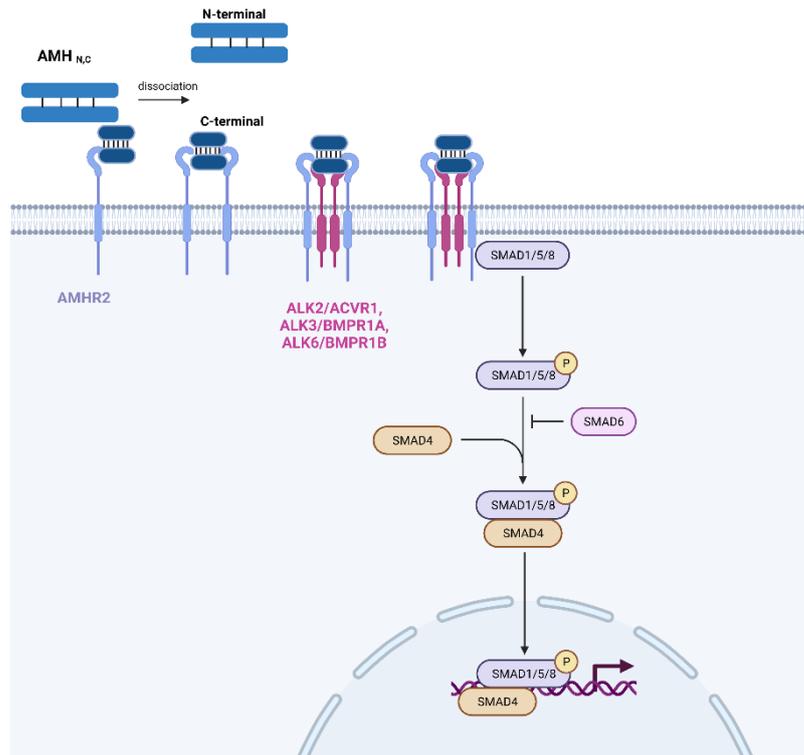


Figure 3 : Voie de signalisation principale de l'AMH. Après clivage du précurseur de l'AMH (AMH precursor = proAMH), comme décrit dans la **Figure 1**, l'AMH est présente sous la forme de l'association non covalente des portions N- et C- terminales de l'hormone (AMH_{N,C} = AMH non-covalent complex). La portion C-terminale de l'AMH (mature domain) va se fixer sur son récepteur spécifique, l'AMHR2, et après sa dissociation du complexe AMH_{N,C}, permettre la dimérisation de l'AMHR2 puis le recrutement et l'activation d'un des récepteurs de type I (ALK2/ACVR1, ALK3/BMPR1A, ALK6/BMPR1B). Le complexe des récepteurs 1 et 2 provoque la phosphorylation de protéines SMAD 1, 5 ou 8, la formation d'un complexe avec une co-smad (SMAD 4), la translocation du complexe au noyau et la régulation directe ou indirecte de l'expression de gènes cibles. Cette voie de signalisation est régulée négativement par une SMAD inhibitrice : la SMAD 6. D'après (di Clemente et al., 2021). Créé avec Biorender.com

Par ailleurs, l'AMH peut également activer la voie de signalisation NFκB dans des lignées cellulaires de cancer du sein (Segev *et al.*, 2000) ou la voie Akt dans des cellules cancéreuses de la granulosa, favorisant la survie cellulaire (Chauvin *et al.*, 2021).

Le gène spécifique de l'AMHR2 a été cloné pour la première fois en 1994 chez le rat et le lapin (di Clemente *et al.*, 1994; Baarends *et al.*, 1995). Dans l'espèce humaine, ce gène est composé de 11 exons répartis sur environ 8kb sur le bras long du chromosome 12. Différents transcrits générés par des épissages alternatifs ont été détectés dans les ovaires de différentes espèces, certains d'entre eux étant inactifs *in vitro*, ce qui pourrait être un mécanisme de

régulation de l'expression de l'AMHR2 à certaines étapes du développement ou de la folliculogénèse (di Clemente *et al.*, 2021).

f/ Rôle gonadique de l'AMH chez la femelle et la femme

Pour rappel, après la sortie de quiescence et le passage du stade de follicule primordial au stade de follicule primaire, la croissance folliculaire est divisée en deux principales phases (**Figure 4**). La première est la croissance folliculaire basale, étape essentiellement contrôlée par des facteurs locaux, qui permet le passage du stade follicule primaire au stade petit follicule antral (2-4mm dans l'espèce humaine) et dure 190 jours dans l'espèce humaine. Ensuite, la phase de croissance terminale, dépendante de la *folliculo-stimulating hormone* (FSH) puis de la FSH et de la *luteinizing hormone* (LH), conduit au recrutement, à la sélection et à la dominance d'un follicule jusqu'au stade pré-ovulatoire pour permettre ensuite l'ovulation. Elle correspond à la phase folliculaire du cycle menstruel chez la femme et dure 15 jours. La sensibilité à la FSH et à la LH des follicules est modulée par des facteurs locaux.

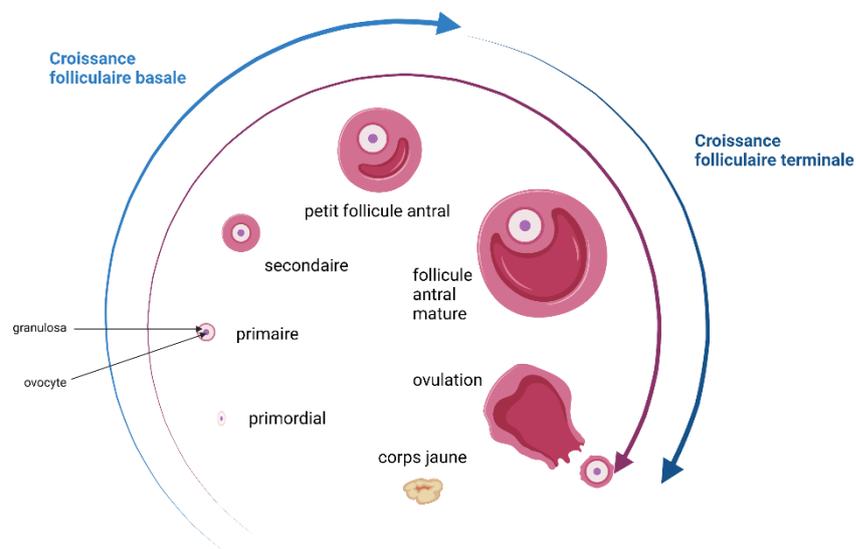


Figure 4 : Schéma de la folliculogénèse. La croissance folliculaire basale, indépendante des gonadotrophines, permet le passage du stade de follicule primaire au stade petit follicule antral. Sous l'action de la FSH puis de la FSH et de la LH, la croissance folliculaire terminale conduit un petit follicule antral, après recrutement, sélection et dominance, à l'ovulation. Créé avec BioRender.com

Pour exercer son action, l'AMH agit sur son récepteur spécifique l'AMHR2. Il est exprimé dans les ovaires, au niveau des cellules de la granulosa mais aussi des cellules de la thèque, dès le stade fœtal, et dans le tissu adjacent aux canaux de Müller (Visser *et al.*, 2006). Chez les ratte adultes, les ARNm de l'AMH et de l'AMHR2 sont fortement exprimés dans les cellules de la granulosa des follicules pré-antraux et petits antraux (Baarends *et al.*, 1995), ce qui suggère une possible action paracrine et autocrine de l'AMH dans l'ovaire.

Rôle de l'AMH sur la folliculogénèse

L'AMH régule la folliculogénèse dès un stade très précoce. En effet, il a été montré chez le rat que l'AMH pouvait inhiber la formation du follicule primordial, constituant la réelle « réserve ovarienne » (Nilsson *et al.*, 2011). D'autres travaux de Nilsson, sur des cultures *ex-vivo* d'ovaires de rats, ont confirmé l'action inhibitrice de l'AMH sur le développement des follicules primordiaux (La Marca *et al.*, 2010) en prouvant l'inhibition de l'expression de facteurs stimulateurs et l'augmentation de facteurs inhibiteurs régulant le cycle cellulaire, en réponse à une stimulation par l'AMH.

Par ailleurs, dans l'ovaire de souris, l'AMH inhibe le développement folliculaire initial (du stade de follicule primordial au stade de follicule primaire) (**Figure 5**). En effet, *in vivo*, des souris femelles invalidées pour l'AMH (AMH *Knock Out*), tout comme celles mutées pour l'AMHR2, présentent une maturation folliculaire accélérée avec initialement, à 25 jours et à 4 mois, une augmentation du nombre de follicules primaires et secondaires comparés à celui des hétérozygotes ou des souris sauvages (*wild-type*); celle-ci conduit ensuite à une perte prématurée des follicules primordiaux visible entre 4 et 13 mois, suggérant une perte prématurée de la réserve ovarienne en l'absence d'un effet inhibiteur de l'AMH (Mishina *et al.*, 1996; Durlinger *et al.*, 1999). Confortant cette hypothèse, l'administration exogène d'AMH lors de la culture *ex-vivo* d'ovaires de rats néonataux en présence d'AMH provoque une diminution de 50 % du pool de follicules en croissance (Durlinger *et al.*, 2002). Chez la femme, des résultats contradictoires ont été obtenus par deux équipes ayant étudié l'effet de l'AMH sur le nombre de follicules primaires sur des biopsies ovariennes (Schmidt *et al.*, 2005; Carlsson *et al.*, 2006). Bien que ces différences puissent s'expliquer par des différences physiologiques entre l'espèce humaine et les espèces mono- ou poly-ovulatoires ou par des éléments techniques, des études plus approfondies sont nécessaires.

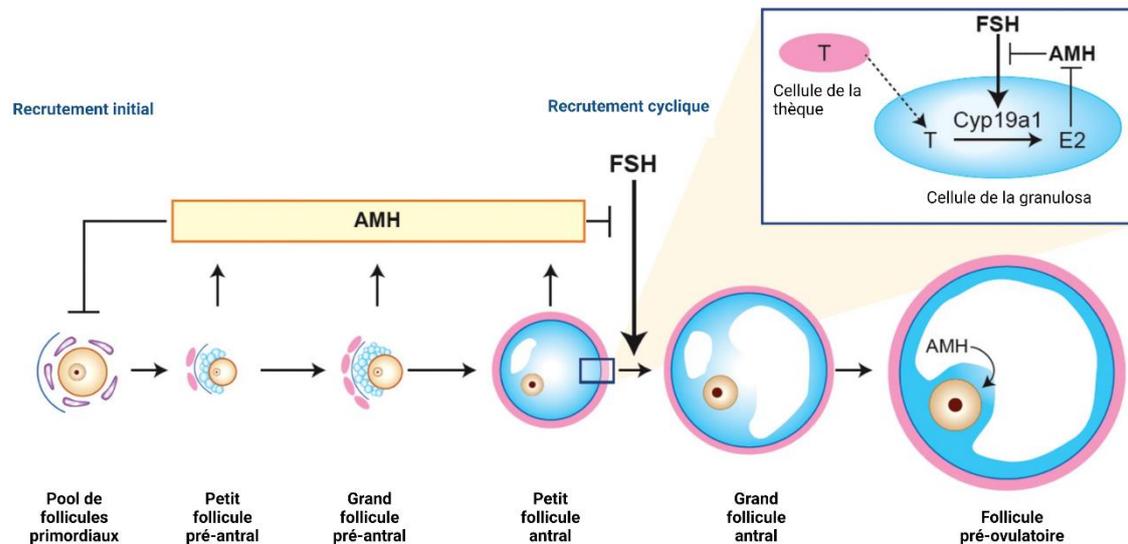


Figure 5 : Rôle de l'AMH sur la croissance folliculaire. La sécrétion de l'AMH par les cellules de la granulosa est majoritaire dans les follicules pré-antraux et petits antraux. L'AMH inhibe le recrutement folliculaire initial en régulant négativement le passage du stade de follicule primordial à celui de follicule primaire. Elle joue également un rôle inhibiteur sur le recrutement folliculaire cyclique FSH-dépendant et la sélection des follicules pré-antraux et petits antraux, en particulier en inhibant l'effet positif de la FSH sur l'expression de l'aromatase (Cyp19a1), enzyme essentielle à la transformation des androgènes en œstrogènes. T, testostérone ; Cyp19a1, aromatase. D'après (Dewailly *et al.*, 2014a) et (van Houten *et al.*, 2010). Créé avec BioRender.com

L'effet de l'AMH sur la croissance des follicules pré-antraux est plus controversé, surtout en fonction des espèces étudiées. En effet, un rôle inhibiteur de l'AMH sur la croissance FSH dépendante des follicules pré-antraux a été initialement mise en évidence chez la souris (Durlinger *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2016), indiquant donc que l'AMH est un élément important pour inhiber la sensibilité folliculaire à l'action de la FSH. Cependant, du sérum de souris a été ajouté lors de ces expériences, ce qui a pu influencer l'action de l'AMH (di Clemente *et al.*, 2021) ; de plus dans cette espèce, l'AMH semble agir principalement comme un facteur de survie des follicules pré-antraux (Visser *et al.*, 2007). Dans plusieurs autres études, allant dans le sens d'un effet inhibiteur de l'AMH sur la croissance folliculaire, il a été montré que de fortes concentrations d'AMH avaient un effet antiprolifératif sur des cellules immortalisées de la granulosa, ou sur des cultures primaires de cellules de la granulosa, humaines ou bovines lutéinisées (di Clemente *et al.*, 2021). Au contraire, dans les expériences de McGee *et al.* chez le rat, l'AMH augmente la croissance des petits follicules pré-antraux et petits antraux en absence ou en présence de FSH (McGee *et al.*, 2001). De même, dans deux autres approches chez le macaque présentant une inactivation de l'AMH (par des anticorps neutralisants) ou sur des cellules de la granulosa (murines immortalisées ou humaines lutéinisées), l'AMH avait un effet prolifératif sur les petits follicules pré-antraux (Xu *et al.*, 2016; Racine *et al.*, 2021). Enfin,

une dernière équipe a récemment suggéré que l'AMH pourrait, à des doses physiologiques, favoriser la croissance de lignées de cellules cancéreuses de la granulosa mais l'inhiber à de fortes concentrations (Chauvin *et al.*, 2021). Ces différences entre espèces, en particulier au stade de follicule pré-antral, peuvent s'expliquer en partie par la différence de sensibilité à la FSH à ce stade : dépendant pour les macaques (Xu *et al.*, 2016; Baba *et al.*, 2017) et indépendant pour les souris (Kreeger *et al.*, 2005).

En revanche, l'effet inhibiteur de l'AMH sur la différenciation du follicule antral, dépendante ou non de la FSH, est mieux documenté. En effet, dans les expériences *in vitro* et *in vivo* chez le macaque, une inactivation de l'action de l'AMH par des anticorps neutralisants augmente les taux circulants d'œstradiol (Xu *et al.*, 2016). Allant dans le même sens, dans les cellules de la granulosa de truie ou de rattes, une répression de l'activité aromatasase (*CYP19A1*) convertissant les androgènes en œstrogènes, et une répression du nombre de récepteurs à la LH (*LHCGR*), éléments spécifiques du follicule mature, ont été observées en présence d'AMH (di Clemente *et al.*, 1994). Cette répression de l'expression de *CYP19A1* par l'AMH a également été montrée dans un modèle murin *in vivo* (Hayes *et al.*, 2016). Chez l'Homme, par des approches *in vitro*, il a été montré que les gènes impliqués dans la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa (*CYP11A* (= SCC : cholesterol side-chain cleavage enzym), *androgen receptor*, *CYP19A*, *LH/CGR* et *Star* (steroidogenic acute regulatory protein) sont réprimés par l'AMH (Grossman *et al.*, 2008; Pellatt *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2013; Sacchi *et al.*, 2016). La diminution d'expression du récepteur à la FSH par l'AMH pourrait également expliquer son implication dans la baisse de sensibilité des follicules à la FSH en présence d'AMH (Pellatt *et al.*, 2011).

Sur des souris prépubères *in vivo* ou des cellules de la granulosa de souris prépubères *in vitro*, l'AMH a aussi un effet inhibiteur sur l'expression de *CYP19A1*, de *LHCGR* et de *Star* mais également sur des éléments de croissance et de différenciation cellulaires (Johnson *et al.*, 2008; Hayes *et al.*, 2016).

Jouant un rôle dans le contrôle de la différenciation folliculaire, l'AMH est très probablement impliquée également dans le processus de sélection du follicule dominant. En effet, une corrélation négative a été démontrée entre le taux d'AMH et celui d'œstradiol dans les liquides folliculaires de petits follicules antraux humains (Andersen and Byskov, 2006; Dumesic *et al.*, 2009). De plus, pendant la sélection folliculaire, une diminution significative de l'expression et de la sécrétion de l'AMH a été corrélée à l'augmentation de sécrétion

d'œstradiol et d'expression de l'aromatase dans des petits follicules humains pré-antraux (Kristensen *et al.*, 2017).

Rôle sur l'atrésie folliculaire

Certains auteurs suggèrent également que l'AMH pourrait protéger les follicules de l'atrésie (Seifer and Merhi, 2014). Initialement évoqué sur le modèle de souris AMHKO (Visser *et al.*, 2007), ceci semble être confirmé par des travaux récents chez les souris adultes et prépubères : le traitement par AMH diminue le nombre de petits follicules atrétiques, dans des ovaires de souris cryoconservés et dans du cortex humain prépubère cryoconservé puis transplanté chez la souris (di Clemente *et al.*, 2021). De plus, plusieurs études ont montré un effet anti-apoptotique de l'AMH sur les cellules ovariennes (Kim *et al.*, 2014).

Autre rôle au niveau ovarien

Enfin, au niveau de l'ovaire, l'AMHR2 est aussi exprimé dans les cellules thécales des follicules pré-antraux et petits antraux à un plus faible niveau que dans les cellules de la granulosa (Campbell *et al.*, 2012; Cheon *et al.*, 2018), ainsi que dans les cellules épithéliales ovariennes (Kim *et al.*, 2014). L'AMH pourrait donc aussi jouer un rôle à ce niveau, par exemple en régulant la stéroïdogenèse des cellules thécales comme cela a été montré chez la brebis (Campbell *et al.*, 2012).

g/ Effets extra-gonadiques de l'AMH

Plus récemment, chez la femelle et la femme, une expression de l'AMHR2 et de l'AMH a également été décrite au niveau d'organes autres que les ovaires élargissant les champs d'action potentiels de cette hormone : au niveau de l'hypothalamo-hypophyse (Bédécarrats *et al.*, 2003; Cimino *et al.*, 2016; Garrel *et al.*, 2016), du tissu mammaire (Segev *et al.*, 2000), de l'utérus (di Clemente *et al.*, 2021), du placenta (Tata *et al.*, 2018) mais également au niveau des poumons (Gustafson *et al.*, 1993), de la prostate, du cerveau (Wang *et al.*, 2005, 2009; Lebeurrier *et al.*, 2008; Cimino *et al.*, 2016; Malone *et al.*, 2019) ou d'organes impliqués dans le métabolisme comme le foie, le pancréas ou le noyau arqué de l'hypothalamus (Cimino *et al.*, 2016; Segerstolpe *et al.*, 2016).

Rôle dans l'axe hypothalamo-hypophysaire

Notre équipe a mis en évidence, depuis plusieurs années, les liens étroits entre AMH et neurones à GnRH (Barbotin *et al.*, 2019; Silva and Giacobini, 2020) suite à la découverte de la présence du récepteur spécifique de l'AMH, l'AMHR2 sur un nombre significatif de neurones à GnRH murins et humains (Cimino *et al.*, 2016).

Chez la souris femelle, en réponse à l'administration centrale d'AMH dans un ventricule cérébral latéral, les neurones à GnRH sont hyperactivés de manière dose-dépendante. Ceci est à l'origine d'une hypersécrétion de LH par l'antéhypophyse, à des taux équivalents à ceux rencontrés en pré-ovulatoire (Cimino *et al.*, 2016). Des expériences d'électrophysiologie ont montré que cette action était directe (Cimino *et al.*, 2016; Barbotin *et al.*, 2019) mais d'autres interactions pour réguler l'activité du neurone à GnRH existent.

Pendant le développement embryonnaire, l'AMH permet également la migration des neurones à GnRH, a priori par une action autocrine de l'AMH (Malone *et al.*, 2019).

Cependant, puisque l'AMHR2 est exprimé dans d'autres zones du cerveau et dans d'autres types cellulaires impliqués dans le contrôle de la reproduction (par exemple dans l'éminence médiane, dans les tanocytes, les cellules endothéliales, la majorité des neurones du noyau arqué), il est possible que l'AMH périphérique puisse avoir une action centrale directe ou indirecte pour activer les neurones à GnRH. En effet, puisque de l'AMH fluorescente administrée par voie intra-veineuse a été détectée dans le cerveau au niveau de l'éminence médiane provoquant ensuite une activation des neurones à GnRH, ceci prouve que la forme bioactive de l'AMH peut passer la barrière hémato-encéphalique, qui autorise le passage de molécules de moins de 35 kDA, pour atteindre l'éminence médiane où les afférences terminales des neurones à GnRH sont situées (Tata *et al.*, 2018).

Il a, par ailleurs, également été montré que, chez le rat, l'AMH agit sur l'antéhypophyse, qui exprime également l'AMHR2, pour réguler la sécrétion de FSH, mais pas celle de LH, spécifiquement chez la femelle et avant la puberté (Garrel *et al.*, 2016). En effet, dans les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse, l'AMH augmente d'une façon dose-dépendante la transcription de la sous-unité β de la FSH (*Fshb*) mais pas celle la sous-unité β de la LH (*LHb*) (Bédécarrats *et al.*, 2003). La GnRH pourrait réguler la sensibilité de l'antéhypophyse à l'AMH en modulant l'expression de l'AMHR2 dans les cellules gonadotropes (Garrel *et al.*, 2019). Par ailleurs, l'AMH est également exprimée, mais faiblement, par les cellules gonadotropes de l'anté-hypophyse et pourrait donc avoir une action autocrine ou paracrine. Il semble donc que

l'AMH/AMHR2 contribue à l'élévation de la FSH chez les femelles avant la puberté et participe à la mise en place de celle-ci, cependant son action réelle à l'âge adulte sur la sécrétion de FSH et de LH doit être encore élucidée.

Effets sur l'utérus

L'AMHR2 est exprimé de la naissance à l'âge adulte dans l'utérus et les oviductes (Arango *et al.*, 2008). Chez la ratte, cette expression diminue graduellement pendant la période post-natale au niveau proximal (col de l'utérus) comme distal, correspondant à l'expansion du stroma et à l'augmentation de sécrétion d'AMH (Saatcioglu *et al.*, 2019). Le traitement prénatal de rattes par de l'AMH pourrait empêcher cette diminution progressive de l'expression d'AMHR2 et inhiber l'expansion du stroma endométrial (Saatcioglu *et al.*, 2019).

A l'âge adulte, l'endomètre humain normal exprime l'AMH et l'AMHR2, et l'apport exogène d'AMH induit l'inhibition de la croissance des cellules stromales ou de lignées cellulaires de cancer endométrial (Renaud *et al.*, 2005).

Le col et le myomètre expriment aussi l'AMHR2 mais, pour le moment, seules des études sur les cellules cervicales (cancéreuses ou non), ont été menées et ont mis en évidence un effet répressif de l'AMH sur leur croissance (Barbie *et al.*, 2003).

Effets sur le placenta

Chez la souris et dans l'espèce humaine l'AMH et l'AMHR2 sont exprimées par le placenta et sur les membranes fœtales (Novembri *et al.*, 2015; Tata *et al.*, 2018). Chez les souris traitées par de l'AMH pendant la gestation, il a été montré une diminution de l'expression de *Cyp19a1* et de la 3β HSD, suggérant que l'AMH pourrait jouer un rôle sur le placenta (Tata *et al.*, 2018). Ceci sera développé dans un chapitre suivant.

Effets sur le sein

L'AMHR2 est exprimé et sécrété par le tissu épithélial mammaire chez la femme et chez la ratte mais pas l'AMH (Segev *et al.*, 2000). Les études convergent pour suggérer que l'AMH

joue un rôle de régulation de la croissance de l'épithélium mammaire, particulièrement pendant les étapes clé de son développement : la puberté et la grossesse (di Clemente *et al.*, 2021).

h/ L'AMH en pratique clinique

En pratique clinique, la concentration sérique d'AMH est utilisée quotidiennement pour apporter une information fiable sur la réserve ovarienne (**Figure 6**).

En effet, au niveau sérique, le taux d'AMH est corrélé au compte de follicules antraux de 2 à 9 mm, visibles en échographie (Dewailly *et al.*, 2014). Celui-ci est lui-même corrélé au pool de follicules primordiaux (Kevenaar *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2011) et ne varie que très peu au cours du cycle menstruel (Dewailly *et al.*, 2014; Lambert-Messerlian *et al.*, 2016), à la différence des autres marqueurs de la réserve ovarienne utilisés jusqu'alors (FSH, E2, Inhibine B...).

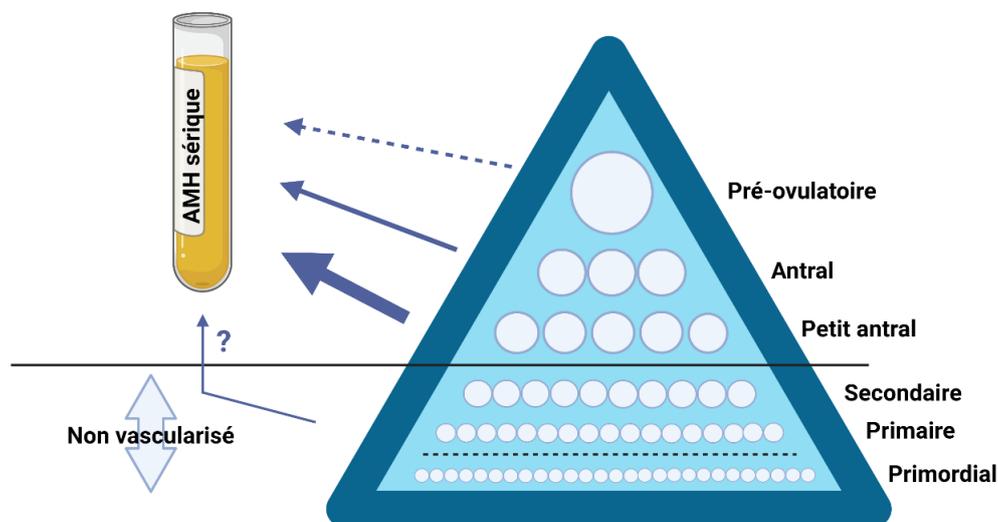


Figure 6 : Rationnel pour utiliser l'AMH comme marqueur de la réserve folliculaire ovarienne. Tous les follicules en croissance sécrètent de l'AMH mais l'AMH sérique ne reflète que la sécrétion en provenance des follicules les plus gros, en contact avec les vaisseaux. Puisque le nombre de follicules à chaque stade de croissance est fortement lié au nombre de follicules à chaque autre stade, le taux d'AMH sérique est considéré comme le reflet de la somme des follicules en croissance. Dans le triangle représentant l'ovaire, les cercles représentent les follicules à leurs différents stades de croissance. Les flèches représentent la sécrétion d'AMH par chacun de ces follicules, l'épaisseur des flèches étant proportionnelle à la part d'AMH sécrétée par chaque stade folliculaire. D'après (Dewailly *et al.*, 2014a). Créé avec BioRender.com

La concentration sérique d'AMH augmente progressivement chez les femmes depuis la naissance pour atteindre un pic entre 16 et 25 ans puis décroît au cours de la vie reproductive pour être nulle à la ménopause (La Marca *et al.*, 2010; Kelsey *et al.*, 2011; Nelson *et al.*, 2011; Lie Fong *et al.*, 2012; Dewailly *et al.*, 2014a) (**Figure 2**). Elle apparaît comme étant un marqueur très sensible de la diminution de la réserve ovarienne, plus sensible que la FSH utilisée jusqu'alors (Tal and Seifer, 2017). Elle est également dosée dans les situations où le compte des follicules antraux n'est pas ou difficilement réalisable, à cause de difficultés techniques de l'échographie (voie sus-pubienne chez les patientes n'ayant jamais eu de rapports sexuels, échogénicité médiocre...).

Le dosage d'AMH est devenu également une aide pour le diagnostic de Syndrome des Oaires Polykystiques (SOPK) ; cette notion sera développée dans le prochain chapitre de cette mise au point. Il est utilisé également dans plusieurs autres situations cliniques comme le dépistage et le suivi de tumeurs de la granulosa, la puberté précoce, le retard pubertaire, les désordres de différenciation sexuelle etc.

Ce dosage a également un intérêt dans l'évaluation de la réserve ovarienne en cours et au décours de la chimiothérapie pour évaluer sa récupération éventuelle et accroître les connaissances sur la gonadotoxicité des traitements de chimiothérapie (Decanter *et al.*, 2010; Peigné and Decanter, 2014; Dezellus *et al.*, 2017; Fréour *et al.*, 2017; Kano *et al.*, 2017). Le développement de dosages très sensibles de l'AMH permettant d'explorer de manière fiable les très basses concentrations a d'ailleurs un intérêt tout particulier dans cette indication (Decanter *et al.*, 2014).

En Assistance Médicale à la Procréation (AMP), l'AMH est un indicateur précieux, non seulement pour connaître la réserve ovarienne, mais également pour prévoir le rendement ovocytaire au décours des protocoles d'hyperstimulation ovarienne contrôlée pour Fécondation In Vitro (FIV) (Broer *et al.*, 2013a, 2013b; Dewailly *et al.*, 2014a), bien que ce rendement ne soit pas prédictif des chances de grossesse après un transfert d'embryon frais (Broer *et al.*, 2013a). Il pourrait, par contre, être un possible marqueur des chances de grossesses cumulées après toute la prise en charge en AMP (Arce *et al.*, 2013; Brodin *et al.*, 2013; Peuranpää *et al.*, 2020). De plus, son taux nous donne une indication sur le risque potentiel d'hypo-réponse à la stimulation ovarienne pour FIV ou de syndrome d'hyperstimulation ovarienne (La Marca *et al.*, 2010; Dewailly *et al.*, 2014a; Vembu and Reddy, 2017). En effet, des taux sériques d'AMH bas (habituellement décrits comme inférieurs à 1 ng/ml (7,14 pmol/L) dans les études) sont prédictifs d'une faible réponse ovarienne à la stimulation. À l'inverse, les femmes avec des taux

sériques d'AMH élevés (habituellement décrits comme supérieurs à 5 ng/ml (35,74 pmol/L) dans les études), situation habituelle chez les femmes atteintes d'un SOPK, ont un risque d'hyper-réponse à la stimulation pouvant conduire à un syndrome d'hyperstimulation ovarienne (Broer *et al.*, 2013b; Vembu and Reddy, 2017).

Le dosage d'AMH sérique peut donc aider le clinicien à adapter les doses de médicaments inducteurs de l'ovulation (gonadotrophines) pour essayer d'éviter les hypo-réponses comme les syndromes d'hyperstimulation ovarienne. Il a donc été adopté rapidement en Assistance Médicale à la Procréation (AMP) pour individualiser les stratégies de stimulation de l'ovulation et affiner les conseils apportés aux patientes. Par exemple en 2013, l'Institut National pour l'Excellence de la santé et du soin (NICE) et la société européenne de reproduction humaine et d'embryologie (ESHRE), ont recommandé le dosage d'AMH comme méthode pour prédire la réponse ovarienne au traitement par gonadotrophines (Ferraretti *et al.*, 2011; "Fertility problems," n.d.). Le consensus de NICE fixe le seuil de 0,75ng/ml (5,4 pmol/L) pour une faible réponse à la stimulation et celui de 3,5 ng/ml (25 pmol/L) pour une forte réponse ("Fertility problems," n.d.). Plus récemment, le groupe POSEIDON a défini plusieurs facteurs, dont l'AMH, comme aidant à la décision de choix du traitement. Le seuil d'AMH alors défini comme étant associé à une faible réponse probable était d'1,2 ng/ml (8,6 pmol/L) (Ferraretti *et al.*, 2011; Alviggi *et al.*, 2016).

Cependant, les seuils de taux d'AMH sérique permettant de conclure à une réserve ovarienne normale, basse ou augmentée sont actuellement toujours en discussion. Cette discussion est d'autant plus importante que l'AMH tend à prendre une place prépondérante, devenant parfois le critère principal de décision de prise en charge ou non en AMP. De plus, il faut rappeler que l'AMH est utile avant une prise en charge en AMP mais dans une population « fertile », elle n'est pas un facteur influençant en soi les chances de grossesse spontanée (Zarek *et al.*, 2015).

i/ Le dosage d'AMH sérique et ses limites

Jusqu'à une période récente, le dosage d'AMH sérique présentait des faiblesses avec une sensibilité faible et une dispersion des valeurs qui donnaient des résultats différents chez une même patiente selon la technique de dosage utilisée. Depuis 2014, de nouveaux dosages automatisés ont vu le jour mais, là encore, avec leurs propres normes et leurs propres seuils décisionnels. Pour pouvoir bien interpréter le résultat d'un dosage d'AMH il est donc

indispensable de bien connaître le type de dosage réalisé et les normes spécifiques à celui-ci (Peigné *et al.*, 2017).

Comme expliqué précédemment, dans la circulation sanguine, l'AMH existe sous différentes formes : une forme inactive, appelée proAMH, et une forme biologiquement active (clivée), appelée AMH_{N,C}, qui est l'association non covalente des fragments N- et C-terminaux (Pankhurst and McLennan, 2013; Pigny, 2014). Les dosages d'AMH disponibles en routine dosent ces deux formes : inactive et active. Ils font appel à une méthode « sandwich » où l'hormone à doser est reconnue par 2 anticorps monoclonaux différents (l'anticorps de capture et l'anticorps de détection). Chaque anticorps peut lier la partie N-terminale ou C-terminale et ainsi on détecte la proAMH et l'AMH_{N,C} (**Figure 7**).

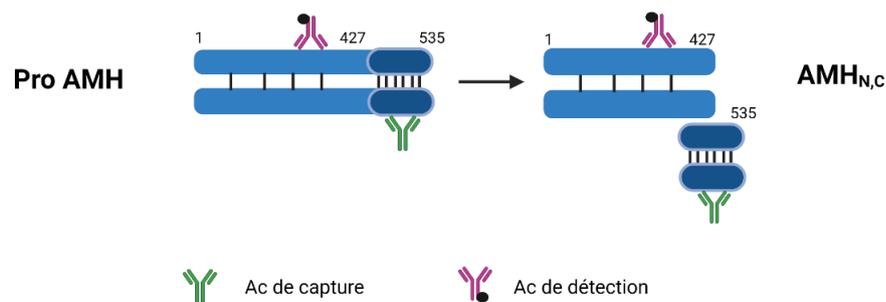


Figure 7 : Exemple de fixation des anticorps pour le dosage d'AMH totale par technique ELISA. L'anticorps (Ac) de capture se fixe sur la portion C-terminale de l'AMH (bleu foncé) et l'anticorps de détection sur la portion N-terminale (bleu clair). Ceci permet la mesure de la pro AMH et de l'AMH_{N,C} dans le sang, rendu sous une seule valeur d'AMH totale. (1, 427 et 535 : acides aminés). Créé avec BioRender.com

Avant 2010, seuls deux dosages différents étaient utilisés : un en Europe (EIS-AMH/MIS par Immunotech puis Beckman-Coulter) dont la commercialisation s'est arrêtée en 2015, un autre aux Etats-Unis (DSL) jusqu'en 2009. Le dosage EIA-AMH/MIS ne permettait pas l'analyse fine d'une réserve ovarienne basse, avec pour valeur mesurable la plus basse 0,35 ng/ml (2,5 pmol/L). De plus, sa spécificité pouvait être limitée par une réaction croisée avec des anticorps anti-hétérophiles présents dans l'échantillon (Cappy *et al.*, 2013). Le dosage DSL a surtout été utilisé aux USA et au Royaume-Uni et avait moins de précision pour les valeurs hautes d'AMH (Dewailly *et al.*, 2014b).

Actuellement en France, 5 types de dosages sont effectués (**Table 1**) : 3 dosages manuels et 2 automatiques, les dosages manuels étant de moins en moins utilisés. Le premier dosage manuel, le Gen II de Beckman Coulter, a été développé à partir de 2009 avec les anticorps de DSL mais sa spécificité est débattue. Sa plage de mesure s'étend de 0,16 ng/ml à 22,5 ng/ml. Il s'agissait du dosage le plus répandu dans la littérature jusqu'à récemment. Avant 2013, une interférence du dosage a été mise en évidence et il faut donc considérer avec prudence les valeurs d'AMH d'avant 2013. La trousse de dosage manuel ultrasensible AL-105i d'Anshlabs serait plus adaptée pour les patientes présentant un taux sérique d'AMH abaissé puisque la valeur la plus basse mesurée est de 0,06 ng/ml (0,43 pmol/l) (Su *et al.*, 2014). Elle est commercialisée depuis début 2012. Enfin, depuis 2013, la société Anshlabs a mis sur le marché un kit manuel de dosage (AL-124i ou « pico-AMH ») dont la limite de quantification est extrêmement basse à 0,0039 ng/ml (0,03 pmol/L). Cette trousse offre encore plus de précision de dosage chez les patientes présentant une AMH effondrée, en particulier après des protocoles de chimiothérapie (Decanter *et al.*, 2014).

Les dosages automatisés actuellement disponibles offrent une meilleure précision (x4), une plus grande rapidité et une meilleure sensibilité fonctionnelle (valeur la plus basse mesurable en pratique courante) (x10) par rapport aux dosages antérieurs (Nelson *et al.*, 2015; van Helden and Weiskirchen, 2015). Ils permettent, de plus, de réduire les variations inter-laboratoires. Deux sont actuellement commercialisés depuis 2014 : Elecsys de Roche et Access Dxi de Beckman-Coulter. L'automate Elecsys-AMH (Roche) ou Cobas utilise les mêmes anticorps que le test Gen II. Ses atouts sont sa rapidité (18 min), le faible volume de sérum requis (50µl) et sa grande reproductibilité par rapport à une méthode manuelle. La plage de mesure va de 0,03 à 23 ng/ml (Gassner and Jung, 2014), autorisant donc des dosages précis pour les valeurs faibles de l'AMH (Hyldgaard *et al.*, 2015). Le standard utilisé est l'AMH bovine.

Le dosage Access Dxi de Beckman-Coulter utilise les mêmes anticorps que l'Elecsys de Roche. La principale différence avec celui de Roche est que le standard utilisé est de l'AMH recombinante humaine. Sa plage de mesure va de 0,02 à 25,4 ng/ml (van Helden and Weiskirchen, 2015).

A côté des problèmes techniques pour l'interprétation du dosage de l'AMH, il existe également des situations particulières où le dosage d'AMH peut être faussé. Ainsi, par exemple, par un effet antigonadotrope, la prise de contraception hormonale et surtout oestro-progestative,

est à l'origine d'une diminution du taux sérique d'AMH de l'ordre de 20 % (Birch Petersen *et al.*, 2015).

| Nom du dosage | Manufacture | Spécificité | Plage de mesure | Standard utilisé | Sensibilité fonctionnelle = limite de quantification | Reproductibilité inter-essai / imprécision | Durée du test (Type d'essai) |
|---------------------------------|-----------------|------------------|---------------------|------------------|--|--|------------------------------|
| Gen II | Beckman-Coulter | Humain Animal | 0,16-22,5 ng/ml | AMH bovine | 0,16 ng/ml | <8% | 5h (manuel) |
| Ultrasensitive (AL-105i) | Anshlab | Humain | 0,06-11,6 ng/ml | rhAMH | 0,06 ng/ml | <6 % | 5h (manuel) |
| Pico AMH | Anshlab | Humain | 0,003-0,75 ng/ml | rhAMH | 0,0039 ng/ml | <6 % | 6h (manuel) |
| AMH Cobas, Elecsys | Roche | Humain Animal | 0,03 -23 ng/ml | AMH bovine | 0,03 ng/ml | 1,8 – 2% | 18 min (automatique) |
| AMH Access Dxi | Beckman-Coulter | Humain | 0,02–24,0 ng/ml | rhAMH | 0,01 ng/ml | 2,87- 4,34 % | 40 min (automatique) |

Table 1 : Caractéristiques des différents dosages d'AMH.

AMH : hormone anti-müllérienne ; rh : recombinante humaine

II - Le Syndrome des ovaires polykystiques (SOPK)

a/ Historique, épidémiologie et bases physiopathologiques

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) a été décrit pour la première fois en 1935 par Stein & Leventhal comme l'association de cycles longs voire d'une aménorrhée, d'un hirsutisme, d'ovaires volumineux sans macrokystes et d'une obésité (Stein and Leventhal, 1935).

Le SOPK est un trouble endocrinien et reproductif complexe et la cause la plus fréquente de troubles de l'ovulation, d'hyperandrogénie et d'infertilité féminine. Il touche 5 à 20% de la population féminine mondiale (Teede *et al.*, 2018).

Il est caractérisé physiologiquement par une hyperandrogénie ovarienne et un trouble de la folliculogénèse à type d'excès de petits follicules en croissance et de blocage de la sélection et de la dominance folliculaire, appelé « follicular arrest ». Ces deux phénomènes sont à l'origine des trois critères diagnostiques du SOPK décrits ci-après : l'excès folliculaire visible en échographie, l'hyperandrogénie clinique ou biologique et les troubles du cycle secondaires aux troubles de l'ovulation.

b/ Définition et présentations cliniques

Le SOPK est défini, depuis 2003, selon les critères de Rotterdam (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group, 2004) révisés en 2018 (Teede *et al.*, 2018) par l'association de deux des trois caractéristiques suivantes :

- Un trouble du cycle pouvant aller jusqu'à l'aménorrhée, témoin d'une dysovulation
- Une hyperandrogénie clinique (définie, entre autres, par un hirsutisme selon le score de Ferriman et Gallwey supérieur à 4,6 ou 8 selon les ethnies, ou une acné sévère, touchant au moins deux zones distinctes du corps) ou biologique (élévation plasmatique de la testostérone totale, de la testostérone libre ou de l'androsténone)

- Un aspect échographique d'ovaires polykystiques (OPK échographique ou PCOM : polycystic ovarian morphology) avec un excès folliculaire défini par plus de 20 follicules de 2 à 9 mm par ovaire ou un volume ovarien supérieur à 10 ml à l'échographie.

Par ailleurs, le diagnostic de SOPK est toujours un diagnostic d'élimination qui ne peut être posé qu'après élimination des autres causes de troubles du cycle ou d'hyperandrogénie comme une hyperprolactinémie, une forme non classique de bloc en 21-hydroxylase (hyperplasie congénitale des surrénales), une tumeur ovarienne ou surrénalienne ou un syndrome de Cushing (Teede *et al.*, 2018).

Toutes les femmes avec SOPK n'ont donc pas les mêmes symptômes, et depuis quelques années on décrit différents phénotypes au sein des femmes avec SOPK, reflétant l'hétérogénéité clinique du syndrome. Quatre phénotypes sont ainsi définis selon l'association des différents symptômes du SOPK que présente la patiente (**Figure 8**). Le plus sévère est le phénotype A qui correspond à l'association des trois critères diagnostiques, définis ci-dessus, les phénotypes B, C et D étant l'association de deux d'entre eux.

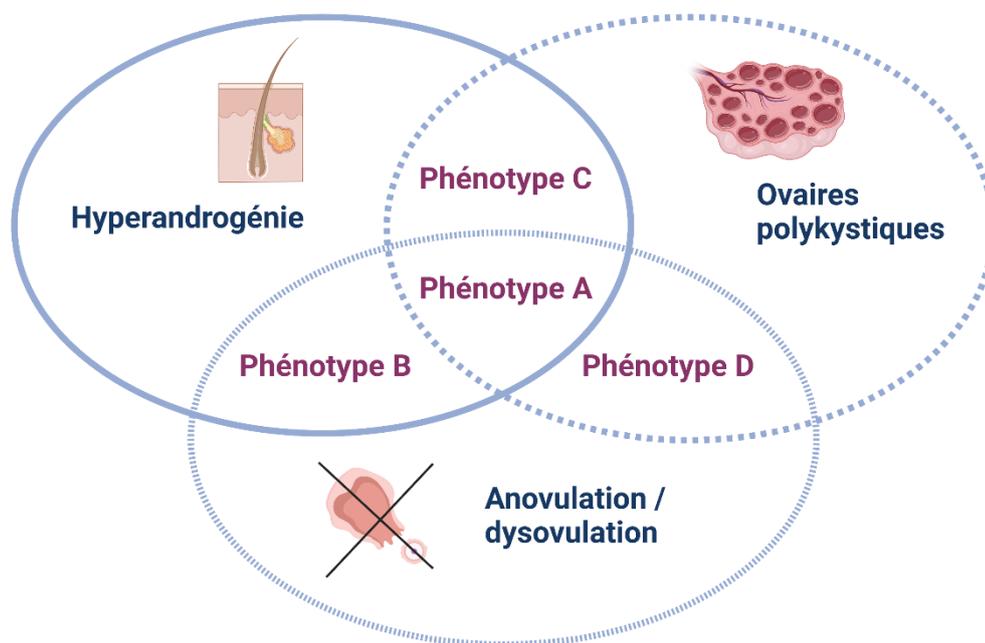


Figure 8 : Les quatre phénotypes de SOPK. Le phénotype A correspond à l'association des trois symptômes cardinaux du SOPK : hyperandrogénie, anovulation/dysoovulation et aspect échographique d'ovaires polykystiques. Les trois autres phénotypes à l'association uniquement de deux d'entre eux : hyperandrogénie et anovulation/dysoovulation pour le phénotype B, hyperandrogénie et aspect échographique d'ovaires polykystiques pour le phénotype C, anovulation/dysoovulation et aspect échographique d'ovaires polykystiques pour le phénotype D. Créé avec BioRender.com

De plus, bien que cela ne fasse pas partie des critères diagnostiques du SOPK, certaines patientes (environ 50 à 60 % des femmes avec SOPK et même 95% des femmes minces sans syndrome métabolique) présentent une augmentation de la pulsatilité de la GnRH/LH se traduisant par un taux élevé de LH basal ou par une inversion du rapport FSH/LH en début de phase folliculaire (Morales *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2015; Stener-Victorin *et al.*, 2020). Les femmes avec SOPK semblent avoir également un défaut de rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GnRH puisqu'il faut, comparé aux femmes témoin, de plus fortes doses d'œstradiol ou de progestérone pour diminuer la fréquence des pulses de GnRH (Pastor *et al.*, 1998; Chhabra *et al.*, 2005).

c/ Syndrome métabolique, insulino-résistance et SOPK

Le SOPK est associé à des troubles métaboliques comme l'obésité, dont la prévalence est variable selon les pays, l'insulino-résistance et le diabète de type 2 pouvant favoriser la survenue ultérieure de troubles cardio-vasculaires (Fauser *et al.*, 2012; Dumesic *et al.*, 2015; Escobar-Morreale, 2018). De même que le SOPK est hétérogène sur le plan de ses phénotypes et présentations cliniques, il l'est également sur le plan des risques métaboliques.

Ainsi, l'insulino-résistance est rencontrée chez 50 à 75 % des patientes avec SOPK et est associée, dans environ 70% des cas, à une obésité androïde, mais même sans obésité, elle peut exister. Elle est présente plus fréquemment chez les patientes de phénotypes A et B et moins fréquemment chez les patientes de phénotype D (Escobar-Morreale, 2018) (**Figure 9**).

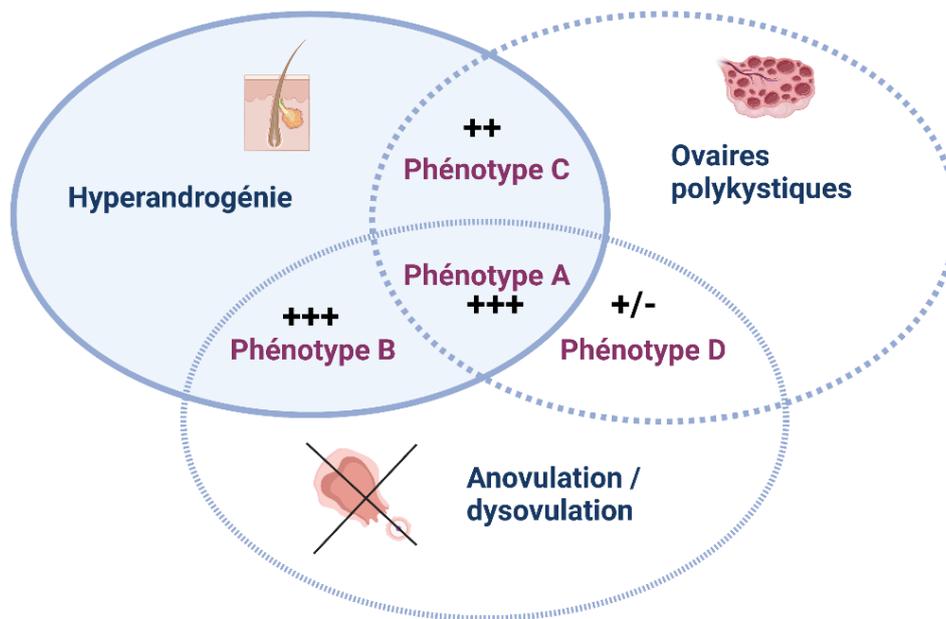


Figure 9 : Liens entre phénotypes du SOPK et troubles métaboliques. Le SOPK est un syndrome hétérogène avec plusieurs phénotypes cliniques et conséquences métaboliques. Les phénotypes associés avec le plus de résistance à l'insuline et de troubles métaboliques sont les phénotypes A et B (hyperandrogénie et anovulation/dysovulation +/- troubles du cycle) (+++). Le phénotype C, qui ne présente pas de troubles de l'ovulation, est associé avec des formes plus modérées d'insulino-résistance et de complications métaboliques (++) . Le phénotype D, sans hyperandrogénie, a une association plus faible avec l'insulino-résistance et les troubles métaboliques (+/-). La force des associations est classée de faible (+/-) à forte (+++). D'après (Escobar-Morreale, 2018). Créé avec BioRender.com

Cette insulino-résistance, à l'origine d'une hyperinsulinémie, doit être prise en charge à cause des complications auxquelles elle peut mener (décrites ci-après) mais également car elle amplifie les symptômes du SOPK comme les troubles du cycle ou l'hyperandrogénie. En effet, l'insuline en excès va directement et indirectement, via la stimulation de sécrétion de LH ou la diminution de synthèse de l'IGFBP1, stimuler la production d'androgènes par les cellules thécales ou les surrénales (Diamanti-Kandarakis and Dunaif, 2012; Escobar-Morreale, 2018). Par ailleurs, elle va diminuer la synthèse de SHBG par le foie et donc augmenter de façon indirecte la portion bioactive des androgènes dans le sérum, accentuant également par ce mécanisme l'hyperandrogénie (Nestler and Jakubowicz, 1996; Dunaif, 1997; Poretsky *et al.*, 1999; Diamanti-Kandarakis and Dunaif, 2012).

Le fait que l'insulino-résistance aggrave un SOPK préexistant ou puisse participer à sa cause est encore débattu mais un lien étroit entre hyperinsulinisme, hyperandrogénie et troubles de l'ovulation existe de façon certaine chez les patientes atteintes de SOPK. Il ne semble pas,

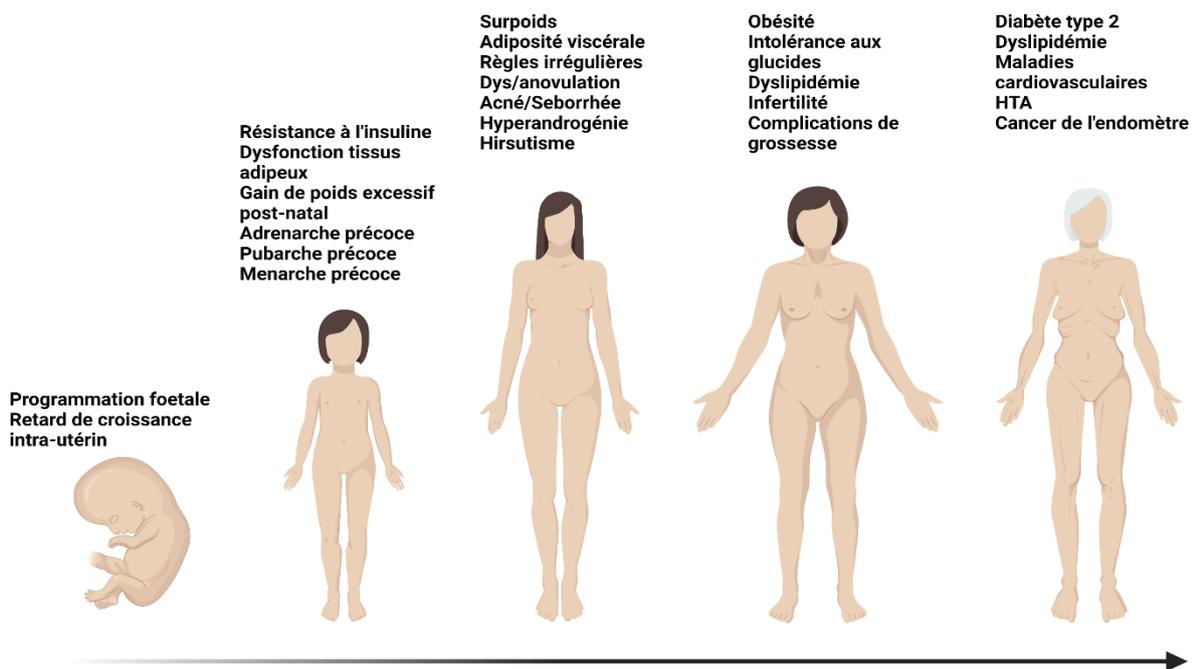
par contre, être l'unique cause puisque des femmes avec une obésité morbide et une extrême insulino-résistance ne développent pas de SOPK, par conséquent, un prérequis pour développer un SOPK serait plutôt un excès d'androgènes (Escobar-Morreale, 2018), comme discuté dans un sous-chapitre ultérieur.

d/ Complications à court, moyen et long terme du SOPK

Le SOPK est souvent associé à des comorbidités qui doivent être recherchées tout au long de la vie (Fauser *et al.*, 2012) (**Figure 10**). A court terme, c'est, en premier lieu, les troubles du cycle, l'hyperandrogénie et l'infertilité qui seront prédominants parfois associés à une obésité, une insulino-résistance ou un syndrome métabolique (Fauser *et al.*, 2012). Pendant la grossesse, ces patientes porteuses d'un SOPK sont plus à risque de complications obstétricales. En particulier, un risque augmenté de pathologies hypertensives de la grossesse (x2 à x3) est rapporté, de même qu'un risque de diabète gestationnel et d'accouchement prématuré (Bruyneel *et al.*, 2014; Palomba *et al.*, 2015). Au niveau fœtal, une augmentation du risque de poids extrême (hypotrophe ou macrosome), de retard de croissance ou de prématurité a été décrite (Bruyneel *et al.*, 2014; Palomba *et al.*, 2015). Toutes ces pathologies obstétricales chez les femmes avec SOPK pourraient être en lien avec des défauts placentaires secondaires à une hypoxie, une vasculopathie, des altérations de transport de nutriments, un stress oxydatif, une inflammation, une lipotoxicité, une fibrose ou des troubles endocriniens (Kelley *et al.*, 2019). Une étude récente a mis en évidence que l'AMH était un des meilleurs marqueurs de risque d'accouchement prématuré chez les patientes présentant un SOPK. Ainsi, les patientes ayant les taux les plus élevés d'AMH étaient le plus à risque d'accouchement prématuré (Hsu *et al.*, 2018) mais également d'autres risques obstétricaux (Valdimarsdottir *et al.*, 2019), sans qu'un lien de cause à effet puisse, pour le moment, être démontré.

A moyen et long terme, des troubles métaboliques ou vasculaires (obésité, hypertension artérielle, intolérance aux hydrates de carbone, dyslipidémie, syndrome métabolique...) (Peigné and Dewailly, 2014; Cooney and Dokras, 2018) mais aussi des troubles psycho-sociaux à type de dépression ou d'anxiété (Cooney *et al.*, 2017) ou encore des cancers de l'endomètre (Barry *et al.*, 2014) peuvent apparaître et doivent donc être recherchés et pris en charge. On décrit ainsi que la prévalence du syndrome métabolique est deux fois plus élevée chez les femmes avec SOPK que chez des femmes témoins appariées sur le poids (Wild *et al.*, 2010). Les femmes avec SOPK ont également un risque augmenté : x 2,5 d'intolérance au glucose et

x 4,5 de diabète de type 2 (Moran *et al.*, 2010). Le collège américain d'endocrinologie, tout comme le français, recommande de dépister le syndrome métabolique chez toutes les patientes avec SOPK dès l'âge de 30 ans (obèses ou non). De plus, l'ESHRE recommande un suivi rapproché des facteurs de risque cardio-vasculaires, une prévention du cancer de l'endomètre par des menstrues régulières et un dépistage, et une prise en charge des risques psycho-sociaux chez ces patientes (Fauser *et al.*, 2012; Teede *et al.*, 2018).



D'après Bellver & al.
J Assist Reprod Genet 2018

Figure 10 : Les différentes complications liées au SOPK tout au long de la vie d'une femme. Pendant la vie in-utéro, le fœtus subit une reprogrammation fœtale et peut souffrir d'un retard de croissance intra-utérin. Pendant l'enfance, les filles porteuses de SOPK peuvent souffrir de dysfonctions métaboliques ou pubertaires. Puis vont apparaître les troubles qui font poser le diagnostic. Progressivement ces troubles reproductifs vont laisser place à des troubles métaboliques, à une infertilité et à des complications obstétricales. Enfin à un âge plus avancé, les patientes atteintes d'un SOPK sont plus à risque de développer des pathologies cardio-vasculaires ou un cancer de l'endomètre. La femme atteinte d'un SOPK nécessite donc un suivi particulier tout au long de sa vie. D'après (Bellver *et al.*, 2018). Créé avec BioRender.com

e/ Hormone anti-Müllerienne et SOPK

Le taux sérique d'AMH est 2 à 4 fois plus élevé chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins (Cook *et al.*, 2002; Pigny *et al.*, 2003; Pellatt *et al.*, 2010) et semble être corrélé à la sévérité des symptômes : plus élevé en présence d'une hyperandrogénie ou d'une aménorrhée (Pigny *et al.*, 2003, 2006; Pellatt *et al.*, 2007; Catteau-Jonard *et al.*, 2012; Matsuzaki *et al.*, 2017; Peigné *et al.*, 2018; Abbara *et al.*, 2019). Par ailleurs, de façon intéressante, les taux circulants d'AMH chez les macaques rhésus femelles hyperandrogéniques sont significativement plus élevés que chez les femelles témoins (Abbott *et al.*, 2017). Ces taux élevés d'AMH pourraient donc, soit impliquer l'AMH dans la pathogénèse de l'anovulation soit, juste refléter un blocage trop important de la folliculogénèse, avec une accumulation de petits follicules sécrétant l'AMH, ce qui sera discuté dans le chapitre suivant.

Plusieurs études, ont mis en évidence que cette élévation du taux d'AMH était le fait, non seulement d'un nombre accru de follicules, mais aussi d'une augmentation d'expression et de sécrétion de l'AMH par les cellules de la granulosa de ces follicules (Pellatt *et al.*, 2007; Catteau-Jonard *et al.*, 2008; Desforgues-Bullet *et al.*, 2010), bien que ceci ait été remis en question récemment (Owens *et al.*, 2019). Sur le plan clinique, on note ainsi parfois une discordance entre les taux d'AMH sérique et le compte des follicules antraux entre les femmes porteuses d'un SOPK et les femmes témoins qui peut s'expliquer par cette production différente d'AMH par follicule (Bhide *et al.*, 2015; Alebic *et al.*, 2018). L'AMHR2 est a priori également surexprimé dans les cellules de la granulosa des femmes SOPK comparé à celui des femmes témoins (Catteau-Jonard *et al.*, 2008), mais ceci n'a pas été confirmé dans une autre étude (Owens *et al.*, 2019).

Hypothèses physiopathologiques de la surexpression de l'AMH chez les femmes avec SOPK

La plupart des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'hyperandrogénie, un des symptômes majeurs du SOPK, induit une surexpression de l'AMH par les cellules de la granulosa des femmes avec SOPK. Cependant, de nombreux facteurs confondants comme la FSH ou l'œstradiol, ou l'augmentation du nombre de follicules en croissance provoqué par les androgènes, peuvent aussi interférer avec l'action des androgènes. Chez les patientes avec SOPK, une corrélation positive est décrite entre les taux d'androgènes et les taux d'AMH

sériques (Pigny *et al.*, 2003; Matsuzaki *et al.*, 2017; Peigné *et al.*, 2018). De plus, chez ces mêmes femmes présentant des troubles de l'ovulation et un aspect échographique polykystique des ovaires, les taux d'AMH sériques sont plus élevés chez les patientes également hyperandrogéniques (phénotype A) que chez celles sans hyperandrogénie (phénotype D) (Sahmay *et al.*, 2013). Enfin, dans les cellules de la granulosa des femmes avec SOPK, qui surexpriment le récepteur aux androgènes (AR), l'administration de 5 α -DHT, un androgène non aromatisable en œstrogène, provoque une surexpression de l'AMH (Pierre *et al.*, 2017; Dilaver *et al.*, 2019). L'hyperandrogénie pourrait aussi agir au niveau épigénétique en provoquant une hypo-méthylation du promoteur de l'AMH favorisant la surexpression de celui-ci (Filippou and Homburg, 2017).

Par ailleurs, l'élévation de la LH, rencontrée chez près de la moitié des femmes avec SOPK (Huang *et al.*, 2015), pourrait également jouer un rôle dans la surexpression de l'AMH chez ces patientes. En effet, plusieurs études ont mis en évidence que les taux de LH et d'AMH sériques, en début de phase folliculaire, sont corrélés dans cette population (Piouka *et al.*, 2009). De plus, la LH, qui n'a pas d'effet sur l'expression de l'AMH dans les cellules de la granulosa des femmes normo-ovulantes, stimule l'expression et la sécrétion de l'AMH dans les cellules de la granulosa humaines lutéinisées de femmes avec SOPK (Pellatt *et al.*, 2007; Pierre *et al.*, 2013). Enfin, la LH, par son action sur les cellules de la thèque, va également accentuer la sécrétion d'androgènes.

Des modifications de la sensibilité à l'œstradiol (qui exerce un effet inhibiteur via les récepteurs β sur l'AMH (Grynberg *et al.*, 2012)) par des modifications des ratios de récepteurs dans les cellules de la granulosa de femmes avec SOPK pourrait aussi participer à la surexpression de l'AMH (di Clemente *et al.*, 2021).

Enfin, des facteurs métaboliques ou inflammatoires pourraient également jouer un rôle dans la surexpression de l'AMH chez les femmes avec SOPK. Cependant, les études s'intéressant aux relations entre AMH et insulino-résistance chez les patientes avec SOPK sont pour le moment contradictoires (di Clemente *et al.*, 2021).

La régulation de l'AMHR2 a été moins étudiée ; toutefois des études *in vitro* suggèrent que sa surexpression dans les cellules de la granulosa de femmes avec SOPK pourrait être expliquée par l'absence de l'effet inhibiteur de l'œstradiol et de la LH, observé chez les femmes témoins (Pierre *et al.*, 2013, 2017).

AMH comme aide au diagnostic de SOPK

Plusieurs études ont évoqué l'intérêt de l'AMH comme une aide possible au diagnostic de SOPK, pouvant même remplacer le critère échographique dans la définition du syndrome. Cependant, les défis pour l'usage de l'AMH comme outil diagnostique sont nombreux : difficultés techniques de dosage, absence de normes internationales, etc. En 2019, Abbara et al. (Abbara *et al.*, 2019) ont suggéré que l'AMH, comme biomarqueur du SOPK, pourrait supplanter le compte des follicules antraux et que les taux les plus élevés d'AMH étaient associés avec le diagnostic le plus sûr de SOPK. Mais, avec les grandes variabilités initiales des dosages d'AMH de première génération et le manque de standards internationaux, l'AMH ne fait pas actuellement partie des critères diagnostiques du SOPK (Teede *et al.*, 2018).

Plus récemment, de nouvelles approches analytiques ont été utilisées (Pankhurst *et al.*, 2017; Wissing *et al.*, 2019). Elles avaient pour objectif de déterminer si les ratios de proAMH et d'AMH_{N,C} dans le sérum étaient modifiés chez les femmes atteintes d'un SOPK et si ces différentes isoformes pouvaient être utilisées pour aider au diagnostic de SOPK. Mais les études existantes ont des résultats contradictoires, certaines rapportant des différences (Pankhurst *et al.*, 2017), d'autres non (Wissing *et al.*, 2019). Ceci sera discuté dans la première partie de la thèse.

Formes moléculaires de l'AMH dans le SOPK

Avant notre étude présentée en partie 1, peu d'auteurs se sont intéressés aux formes moléculaires de l'AMH dans le sérum ou dans le liquide folliculaire de femmes avec SOPK. Une première étude, incluant 22 patientes (9 témoins et 13 SOPK), retrouvait une proportion plus élevée d'AMH_{N,C} (clivée) dans le liquide folliculaire des patientes avec SOPK par rapport à celle de patientes témoins (Pierre *et al.*, 2016). La proportion d'AMH clivée semblait également majorée dans le sérum de cinq patientes avec SOPK, mais seulement une faible proportion de cette AMH était, *a priori*, capable de se lier à l'AMHR2 (Pierre *et al.*, 2016). Ces résultats sont concordants avec ceux présentés par l'équipe de Pankhurst *et al.* qui retrouvaient un ratio proAMH/AMH totale significativement diminué chez les patientes avec SOPK, allant donc dans le sens d'une proportion circulante d'AMH active clivée plus importante chez les femmes avec SOPK. Il faut cependant noter que, dans cette étude, les patientes avec SOPK étaient significativement plus jeunes et présentaient un indice de masse corporelle (IMC) ainsi qu'un tour de taille significativement plus élevés que les patientes témoins. Ainsi, à l'inverse,

en comparant des femmes avec SOPK et des témoins appariés sur l'âge et l'IMC, Wissing *et al.* en 2019, ne retrouvaient pas de différence significative entre les différentes isoformes de l'AMH, entre des patientes avec ou sans SOPK (Wissing *et al.*, 2019).

Ainsi, plus que le SOPK, c'est peut-être plus le phénotype métabolique et en particulier l'IMC qui serait lié au ratio des différentes formes d'AMH circulantes, les données dans le liquide folliculaire nécessitant d'être confirmées à plus grande échelle.

f/ Hypothèses physiopathologiques du SOPK

Malgré de nombreux travaux de recherche, la physiopathologie du SOPK est toujours mal expliquée. Comme décrit plus haut, le SOPK est caractérisé par une hyperandrogénie ovarienne, un excès de petits follicules en croissance et un blocage de la sélection et de la dominance folliculaire, appelé « follicular arrest ».

L'hyperandrogénie ovarienne

L'hyperandrogénie semble être primitivement ovarienne à cause d'une dérégulation intrinsèque des cellules stéroïdogènes de la thèque interne. En effet, les gènes impliqués dans la stéroïdogénèse au niveau de celle-ci présentent une activité accrue de leurs promoteurs et une stabilité de leurs ARN messagers (Wickenheisser *et al.*, 2000, 2005). De même, par des études de génétique moléculaire plus larges, il a été montré que des dysrégulations des gènes d'enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse ovarienne sont retrouvées dans les cellules thécales des femmes avec SOPK (CYP 450 SCC= CYP 11A1, 3β HSD 1) (Wood *et al.*, 2003, 2004; Escobar-Morreale *et al.*, 2005).

Les troubles de la folliculogénèse

L'excès de petits follicules antraux

Le SOPK est caractérisé par un excès de petits follicules en croissance pré-antraux ou petits antraux alors que le stock de follicules primordiaux est normal (Hughesdon, 1982). Les

androgènes ovariens pourraient être à l'origine de cet excès folliculaire. En effet, (1) l'administration d'androgènes à des femelles de différentes espèces conduit à un excès folliculaire équivalent à celui rencontré dans le SOPK, (2) une corrélation entre taux plasmatique d'androgènes et nombre de follicules ovariens de 2 à 5 mm est retrouvée chez la femme et enfin, (3) l'excès folliculaire est retrouvé dans d'autres états d'hyperandrogénie pathologique (Vendola *et al.*, 1998; Jonard *et al.*, 2003). Deux mécanismes pourraient être à l'origine de cet excès folliculaire : un ralentissement de la croissance folliculaire (Hughesdon, 1982; Maciel *et al.*, 2004) et une moindre atresie des follicules (Webber *et al.*, 2003), par diminution de l'apoptose des follicules des femmes avec SOPK (Webber *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2008).

Le « follicular arrest »

Réponse prématurée à la LH ?

Une acquisition prématurée des récepteurs de la LH au niveau des cellules de la granulosa est retrouvée au niveau des follicules de femmes avec SOPK ; elle à l'origine d'une « lutéinisation » partielle prématurée du follicule avec stagnation de la croissance folliculaire et altération du processus de sélection du follicule dominant (Willis *et al.*, 1998; Jakimiuk *et al.*, 2001). La cause de cette acquisition prématurée des récepteurs à la LH reste encore inconnue. Les androgènes, l'insuline ou l'AMH pourraient être impliqués.

En plus d'une acquisition prématurée, les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque des petits follicules des femmes avec SOPK, comparées à celles de femmes témoins, surexpriment les récepteurs à la LH (Jakimiuk *et al.*, 2001). Combiné aux taux de LH plus élevés chez certaines femmes atteintes de SOPK, ceci conduit à l'hyperstimulation de cellules de la thèque et participe à la lutéinisation prématurée des cellules de la granulosa des patientes avec SOPK.

Par ailleurs, un traitement par la LH augmente l'expression de l'AMH dans les cellules de la granulosa des femmes avec SOPK dysovulantes, ce qui n'est pas retrouvé chez les femmes normo-ovulantes (Pierre *et al.*, 2013).

Défaut d'action de la FSH

L'autre caractéristique spécifique des patientes avec SOPK qui présentent des troubles du cycle est l'absence de fenêtre de FSH qui résulte de l'anovulation et inversement. Un excès local « d'inhibiteurs » de la FSH pourrait être impliqué et l'AMH semble être un candidat intéressant.

Rôle de l'AMH

Depuis plusieurs années, les données s'accumulent sur le rôle probable de l'AMH dans la physiopathologie du SOPK. En effet, chez les femmes avec SOPK ayant un taux d'AMH élevé, celui-ci pourrait avoir une action exacerbée sur la croissance et la survie folliculaire ainsi que sur la sensibilité à la FSH.

L'action inhibitrice de l'AMH sur l'atrésie folliculaire pourrait participer à l'augmentation du pool de follicules pré-antraux et petits antraux, rencontrée dans cette pathologie.

Par ailleurs, l'action inhibitrice de l'AMH sur l'aromatase et sur les processus FSH-dépendants responsables de la sélection et de la dominance folliculaire pourrait conduire à l'arrêt de croissance folliculaire ou « follicular arrest », un autre élément clé du SOPK conduisant aux troubles de l'ovulation (Dewailly *et al.*, 2014a). Il est important de noter que comparativement aux femmes normo-ovulantes, les femmes anovulantes ont des taux d'AMH 18 fois plus élevés (Tal *et al.*, 2014), taux d'AMH notamment corrélés à la sévérité des troubles de l'ovulation (Catteau-Jonard *et al.*, 2012). En accord avec cette hypothèse, deux études, qui se sont intéressées au moment spécifique de sélection du follicule, devenant FSH dépendant et sécrétant de l'œstradiol, ont confirmé que l'inhibition de l'expression de l'AMH et la baisse de sécrétion de celle-ci au niveau du liquide folliculaire, habituellement retrouvée chez les patientes normo-ovulantes, n'était pas présente chez les patientes anovulantes, pouvant ainsi participer au trouble de l'ovulation (**Figure 11**) (Kedem *et al.*, 2013; Kristensen *et al.*, 2019).

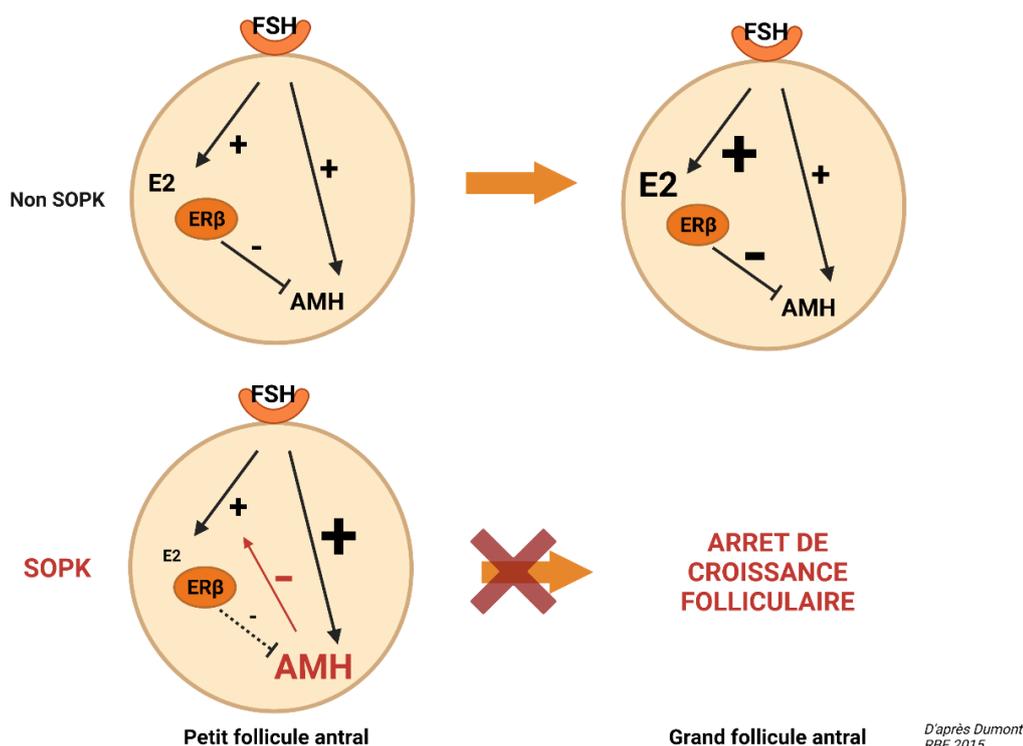


Figure 11 : Liens entre FSH, œstradiol et AMH au cours de la folliculogénèse entre femmes avec SOPK et femmes normo-ovulantes dans les petits et grands follicules antraux. Jusqu'au petit stade antral, la sécrétion d'AMH est stimulée par différents facteurs comme la FSH. La production d'œstradiol (E2) par l'aromatase, sous l'influence de la FSH, est altérée par l'effet inhibiteur de l'AMH sur l'aromatase. Lorsque la concentration en œstradiol atteint un certain seuil dans les gros follicules antraux, l'œstradiol est capable d'inhiber complètement l'expression de l'AMH via son récepteur β ($Er\beta$), qui prédomine dans les follicules en croissance. Dans les follicules des femmes avec SOPK, le niveau élevé d'AMH et le manque de production d'E2 altèrent le passage au stade folliculaire supérieur conduisant ainsi à l'arrêt de croissance folliculaire.

D'après(Dumont *et al.*, 2015) Adapté de (Grynberg *et al.*, 2012). Créé avec Biorender.

Comme le montrent des travaux de notre équipe, l'action exagérée de l'AMH chez les patientes avec SOPK est aussi retrouvée, dans un modèle de souris exposées *in utero* à de l'AMH, au niveau extra-gonadique sur le cerveau ou le placenta (Tata *et al.*, 2018). Enfin, le premier modèle animal de SOPK spontané, chez le rat, présentant tous les symptômes reproductifs et métaboliques du SOPK humain, a des taux élevés de LH et d'AMH associés à une diminution de l'atrésie folliculaire, une augmentation du nombre de petits follicules et une anovulation (Bourgneuf *et al.*, 2021).

Ainsi l'AMH, dont le taux sérique est en excès chez les femmes avec SOPK présentant un phénotype sévère, pourrait contribuer aux altérations gonadiques et hormonales observées dans le syndrome, en particulier via un défaut d'inhibition de son expression au moment de la croissance folliculaire FSH dépendante.

La dysfonction neuro-endocrine

L'élévation de la LH, rencontrée chez 50 à 60 % des femmes avec SOPK et même 95% des femmes minces sans syndrome métabolique (Huang *et al.*, 2015), est attribuée à une hypersécrétion de GnRH par l'hypothalamus. Comme exposé précédemment chez la souris, le fait que l'AMH puisse induire une sécrétion de LH par une hyperactivation du neurone à GnRH ouvre la voie à une possible explication physiopathologique chez la femme (Cimino *et al.*, 2016) (**Figure 12**). Cette hyperactivation est également retrouvée dans les modèles animaux exposés *in utero* aux androgènes (Dumesic *et al.*, 2020).

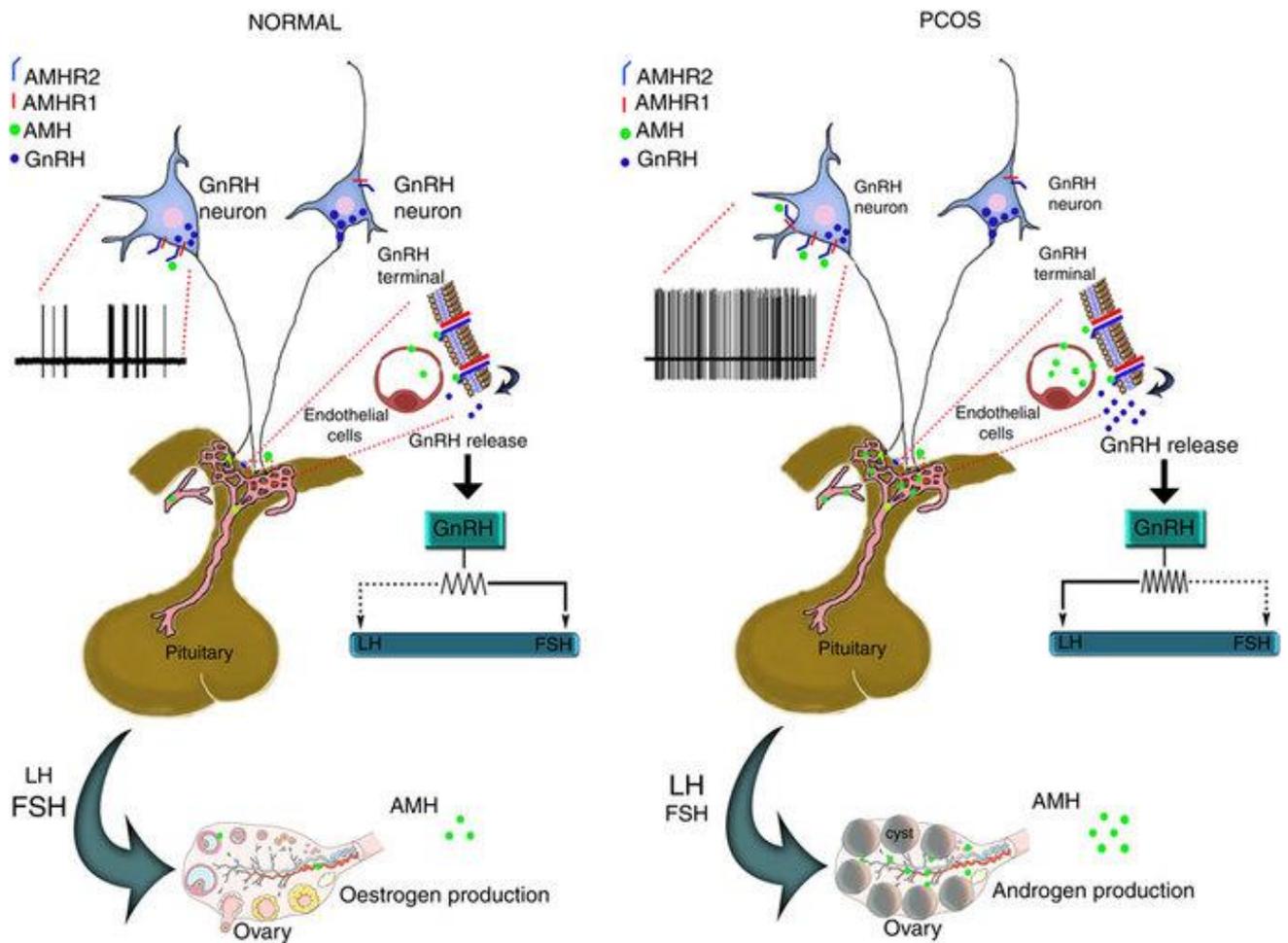


Figure 12 : Effet hypothalamique de l'AMH chez les femmes normales (NORMAL) ou atteintes d'un SOPK (PCOS). Les neurones à GnRH (GnRH neurons) expriment le récepteur spécifique de l'AMH, AMHR2, ainsi que les récepteurs de type 1 (AMHR1 : ALK 2/3/6). L'hypothèse est que l'AMH puisse passer la barrière hémato-encéphalique par les capillaires fenestrés pour agir directement sur les neurones à GnRH. L'AMH exerce un effet stimulant sur la pulsativité des neurones à GnRH, permettant le relargage des gonadotrophines, et préférentiellement la FSH par l'hypophyse (pituitary), pour rendre possible la croissance folliculaire au sein de l'ovaire (ovary) et la production principale d'œstrogènes (oestrogen). Chez les femmes avec SOPK, les taux d'AMH circulants sont 2 à 3x plus élevés chez les femmes témoins, ainsi les neurones à GnRH pourraient être sur-stimulés, favorisant le relargage préférentiel de la LH plutôt que de la FSH par l'hypophyse. La LH sur l'ovaire pourrait favoriser la production des androgènes ovariens et participer à l'hyperandrogénie caractéristique de ce syndrome. FSH, follicle-stimulating hormone; LH, luteinizing hormone (Cimino et al., 2016).

g/ Héritabilité du SOPK et hypothèses physiopathologiques

Il est actuellement décrit que 35 à 70 % des filles de femmes avec SOPK vont développer un SOPK après la puberté (Crosignani and Nicolosi, 2001; Dumesic *et al.*, 2020) mais la cause de cette héritabilité reste inconnue : génétique ? environnementale ? épigénétique ? autre ?

Génétique

Les études de cluster familiales, de jumeaux ou pangénomiques (GWAS= genome wide associated studies) ont mis en évidence ce caractère héritable très important en mettant en avant certains gènes ou *locus* associés à différents phénotypes de SOPK (Filippou and Homburg, 2017; Escobar-Morreale, 2018; Raperport and Homburg, 2019; Dumesic *et al.*, 2020). Cependant, la recherche de gènes candidats ou de polymorphismes pour expliquer l'héritabilité du SOPK est toujours en cours et peine à donner une réponse claire. Les gènes potentiellement impliqués peuvent être regroupés en plusieurs catégories : ceux en lien avec la fonction reproductive (sécrétion ou action des gonadotrophines, fonction ovarienne, synthèse ou action des androgènes), ceux en lien avec le métabolisme (insulino-résistance, inflammation cytokinique) et les autres (Deligeoroglou *et al.*, 2009; Stener-Victorin *et al.*, 2020). Par ailleurs, des polymorphismes de l'AMH ou de son récepteur sont associés au SOPK (Kevenaar *et al.*, 2008; Georgopoulos *et al.*, 2013; Pabalan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017) dont certains ont une bio-activité réduite (Kevenaar *et al.*, 2008; Gorsic *et al.*, 2017, 2019) et pourraient être associés à environ 3% des cas de SOPK familiaux. Cependant, au total, les gènes (ou groupes de gènes) actuellement décrits comme ayant un lien avec le SOPK ne peuvent expliquer que moins de 10 % de cette héritabilité (Azziz, 2016; Dumesic *et al.*, 2020).

Origine environnementale / épigénétique

De plus en plus d'évidences s'accumulent en faveur d'une altération du développement, d'origine environnementale ou épigénétique, pendant la vie fœtale ou prépubère pouvant être à l'origine des désordres reproductifs et métaboliques rencontrés dans le SOPK (Tata *et al.*, 2018; Risal *et al.*, 2019; Mimouni *et al.*, 2021). Chez les femmes avec SOPK, des altérations hormonales pendant la grossesse pourraient participer à une augmentation du risque, pour le

foetus, de développer un SOPK à l'âge adulte (Sir-Petermann *et al.*, 2007). Ces hypothèses sont en accord avec le concept de l'origine développementale de certaines pathologies qui émerge de l'hypothèse de Barker selon laquelle les altérations *in utero* du milieu nutritionnel, endocrinien, métabolique ou inflammatoire, pourraient induire des modifications d'expression génique ou épigénétiques pendant le développement fœtal à l'origine d'une prédisposition au développement de pathologies ultérieures (Barker, 2007; Padmanabhan *et al.*, 2016; Kelley *et al.*, 2019). Une étude pilote a, d'ailleurs, récemment, mis en évidence des profils de méthylations différents de certains gènes impliqués dans le métabolisme entre le sang de cordon d'enfants de femmes avec SOPK et de celui d'enfants de femmes témoins (Lambertini *et al.*, 2017).

Rôle des androgènes

L'exposition prénatale aux androgènes, à la testostérone ou à la dihydrotestostérone, est décrite comme la condition expérimentale la plus à même de reproduire chez l'animal des phénotypes proches du SOPK (Walters *et al.*, 2018; Stener-Victorin *et al.*, 2020). En effet, chez la souris mais également chez le rat, la guenon, la brebis, l'exposition d'un fœtus féminin à une hyperandrogénie exogène provoque l'apparition d'un phénotype SOPK à l'âge adulte (Abbott *et al.*, 2005; Monniaux *et al.*, 2019; Raperport and Homburg, 2019; Stener-Victorin *et al.*, 2020). De plus, des études épidémiologiques ont démontré que l'exposition prénatale aux androgènes pouvait directement prédisposer les enfants à développer un phénotype SOPK associé à toutes les complications reproductives, neuroendocrines, métaboliques, cardiovasculaires et psycho-sociales (Hart *et al.*, 2010; Filippou and Homburg, 2017; Hakim *et al.*, 2017; Dumesic *et al.*, 2020). Par exemple, dans le travail de Hart *et al.*, les taux de testostérone maternels en milieu de grossesse étaient corrélés positivement aux taux d'AMH des filles à l'adolescence, suggérant que l'élévation de testostérone au milieu de la grossesse perturbe la fonction ovarienne des fœtus féminins (Hart *et al.*, 2010). Ces effets pourraient être directs sur l'expression des gènes contrôlant la production des hormones stéroïdes, la folliculogénèse, la pulsativité de la GnRH et la résistance à l'insuline (Filippou and Homburg, 2017; Raperport and Homburg, 2019). Ils sont retrouvés sur plusieurs générations chez la souris exposée à la première génération aux androgènes, en lien avec des modifications épigénétiques surtout de type hypo-méthylation (Risal *et al.*, 2019).

Pendant la grossesse, une augmentation physiologique du taux d'androgènes circulants est observée. Les femmes porteuses d'un SOPK présentent des taux d'androgènes circulants

(testostérone ou SDHEA ou androsténone selon les études) supérieurs à ceux de femmes témoins, indépendamment du sexe fœtal (Sir-Petermann *et al.*, 2002; Maliqueo *et al.*, 2013, 2015; Glinborg *et al.*, 2018; Piltonen *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020). Ainsi, chez les femmes avec SOPK le fœtus pourrait se retrouver dans un environnement d'excès androgénique même si la virilisation d'un fœtus féminin n'est pas observée (Kelley *et al.*, 2019). Néanmoins, il est habituellement décrit que les filles de femmes avec SOPK présentent une distance anogénitale augmentée ou un excès de sébum à la naissance, signe d'une exposition *in utero* aux androgènes (Homburg *et al.*, 2017; Barrett *et al.*, 2018). Hypothèse qui est renforcée par le fait que les taux de testostérone dans le liquide amniotique de filles de femmes avec SOPK sont plus élevés que ceux des filles de femmes témoins (Palomba *et al.*, 2012). Puisqu'*a priori* les androgènes maternels ne traversent pas la barrière placentaire (Sathishkumar *et al.*, 2011) et que l'aromatase placentaire est censée « protéger » le fœtus d'un excès d'androgènes, un mécanisme possible de l'effet de l'hyperandrogénie maternelle est une modification de la stéroïdogénèse de l'unité fœto-placentaire à l'origine d'une modification des taux d'androgènes à ce niveau et chez le fœtus *in utero* (Kelley *et al.*, 2019). En effet, expérimentalement chez le rongeur, cette hyperandrogénie provoquée par une administration exogène de testostérone, est associée, en particulier, à l'augmentation de l'expression placentaire des récepteurs aux androgènes, aux œstrogènes et de la 17 β HSD, une des enzymes impliquée dans la stéroïdogénèse placentaire (Sun *et al.*, 2012). De plus, comme mentionné plus haut, au deuxième trimestre de la grossesse, des taux de testostérone plus élevés ont été mesurés dans le liquide amniotique de fœtus féminins de femmes enceintes porteuses d'un SOPK (Palomba *et al.*, 2012). Ceci va dans le sens d'une modification de la sécrétion des stéroïdes par les ovaires fœtaux puisque 70% des productions du liquide amniotique à ce terme sont d'origine fœtales ; de plus, à ce terme, les ovaires fœtaux sont capables de métaboliser la prégénolone en DHEA et en androsténone, ainsi que de sécréter DHEA, progestérone, œstrone et, dans des quantités plus faibles, androsténone, œstradiol et testostérone (Filippou and Homburg, 2017; Dumesic *et al.*, 2020). Enfin, les femmes atteintes d'une forme classique d'hyperplasie congénitale des surrénales (par déficience en 21-hydroxylase), qui sont exposées *in utero* à des taux très élevés d'androgènes, développent une hypersécrétion de LH et des dysfonctions reproductives proches du SOPK, même après élimination de l'hyperandrogénie par des traitements post-nataux (Filippou and Homburg, 2017).

Ainsi, l'exposition prénatale aux androgènes semble être un élément majeur déclencheur de la programmation développementale du SOPK tant sur le plan métabolique que reproductif.

Rôle de l'insulino-résistance

L'insuline, l'IGF-I et l'IGF- II sont connus pour inhiber l'activité de l'aromatase dans le trophoblaste humain (Nestler, 1993) et pour stimuler l'activité de la 3 β -HSD (Nestler, 1989), deux enzymes majeures de la stéroïdogénèse placentaire. Ainsi, un hyperinsulinisme maternel, comme observé chez certaines femmes porteuses d'un SOPK, pourrait favoriser une hyperandrogénie placentaire. En effet, les femmes présentant un diabète gestationnel ont un taux élevé de testostérone dans le liquide amniotique (Barbieri *et al.*, 1986). Par ailleurs, l'hyperandrogénie favorise, dans l'autre sens, l'hyperinsulinisme maternel (Filippou and Homburg, 2017). L'interaction entre troubles stéroïdogène et métabolique chez les femmes avec SOPK est très proche et il est difficile parfois de différencier lequel est à l'origine de l'autre. Cependant, il ne semble pas que l'hyperinsulinisme maternel en soi puisse conduire au développement d'un SOPK chez le fœtus car les femmes enceintes diabétiques sans SOPK ne semblent pas avoir plus de risque de donner naissance à des filles porteuses de SOPK. L'hyperinsulinisme pourrait donc jouer un rôle synergique dans la pathogénèse du SOPK mais ne semble pas être l'élément majeur pour la transmission du syndrome.

Rôle de l'AMH

Des travaux de notre équipe chez la souris (Tata *et al.*, 2018) ont mis en évidence que, lorsque l'on injecte de l'AMH (forme clivée puis forme pré-proAMH) à des souris gestantes en intra-péritonéal en fin de gestation, les souriceaux femelles présentent un phénotype de SOPK (hyperandrogénisation à la naissance puis hyperandrogénie à l'âge adulte, hyperpulsatilité de la LH et troubles du cycle). Pendant la gestation, des taux circulants de testostérone chez les souris gestantes ayant reçu de l'AMH sont trois fois plus élevés que ceux chez les témoins. Cette action de l'AMH sur l'androgénisation maternelle est probablement de double origine : (1) une action centrale exagérant la stéroïdogénèse ovarienne en augmentant la pulsatilité de la GnRH et de la LH et (2) une action périphérique en inhibant l'aromatase placentaire provoquant une augmentation de la testostérone biodisponible (Tata *et al.*, 2018). Par ailleurs, cette exposition *in utero* à l'AMH et à l'hyperandrogénie qu'elle engendre, a pour conséquence, chez les souriceaux, une hyperactivation des neurones à GnRH qui persiste à l'âge adulte (**Figure 13**) et pourrait être la base des anomalies neuro-endocrines qui accompagnent le SOPK. En effet, la co-administration prénatale d'un antagoniste de la GnRH en même temps que l'AMH prévient l'apparition du syndrome suggérant un rôle critique du neurone à GnRH dans la programmation du syndrome. Une action directe de l'AMH sur les neurones fœtaux

semble moins probable puisque les expériences menées dans notre équipe tendent à prouver que l'AMH ne passe pas la barrière placentaire (Tata *et al.*, 2018).

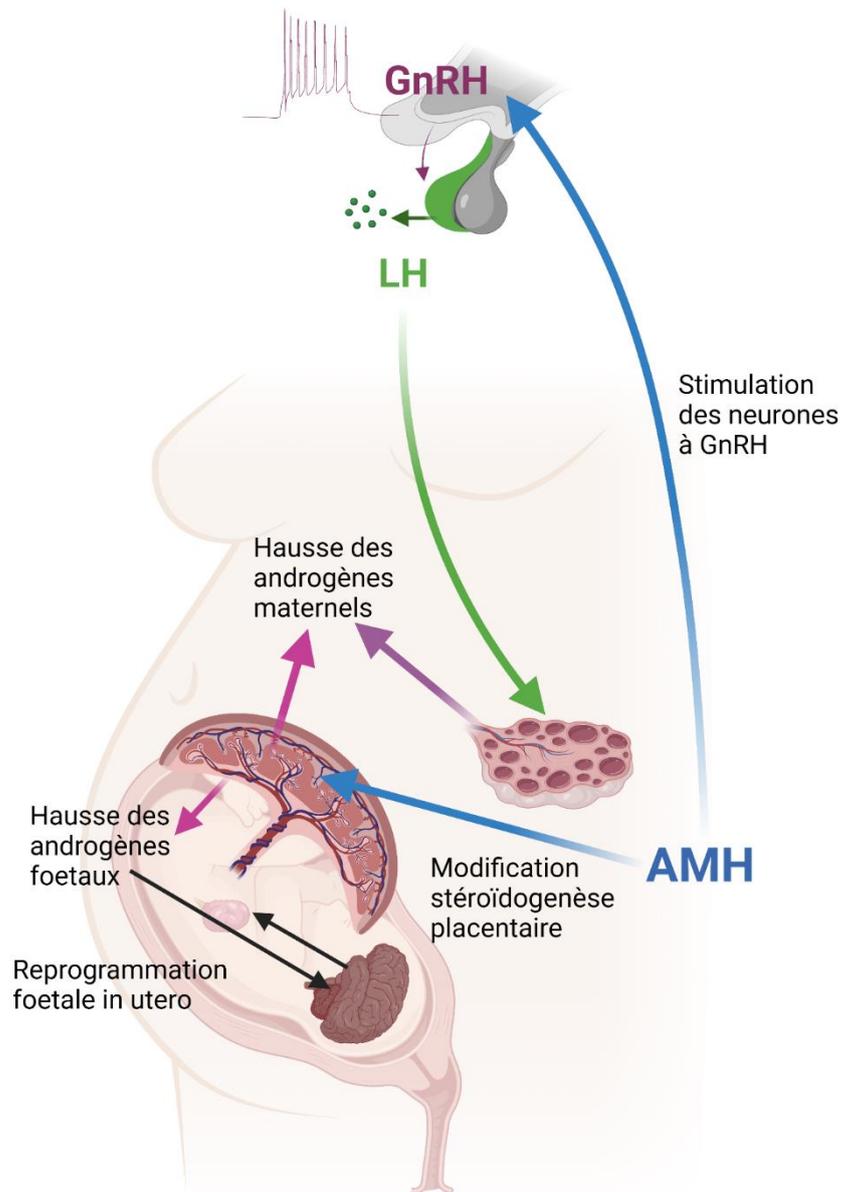


Figure 13 : Hypothèses physiopathologies impliquant l'AMH dans l'héritabilité du SOPK. Chez les femmes avec SOPK, l'AMH reste plus élevée pendant la grossesse que chez les témoins. Cette AMH pourrait favoriser un état d'hyperandrogénie maternelle et fœtale par deux actions potentielles sur des organes qui possèdent son récepteur spécifique (AMHR2) : les neurones à GnRH et le placenta. Ainsi, elle pourrait (1) en stimulant les neurones à GnRH provoquer une hausse du taux de LH circulant pouvant favoriser une hyperandrogénie ovarienne ; (2) en agissant au niveau du placenta, modifier la stéroïdogénèse placentaire à l'origine d'une hyperandrogénie fœto-placentaire. Cette hyperandrogénie pourrait agir au niveau central chez le fœtus pour reprogrammer les neurones à GnRH qui pourraient ensuite agir pour reprogrammer l'ovaire fœtal. D'après (Tata *et al.*, 2018; Barbotin *et al.*, 2019; Silva and Giacobini, 2020). Créé avec BioRender.com.

Plus récemment, une dernière étude de notre équipe a mis en évidence que ce phénotype « SOPK » provoqué par l'administration d'AMH *in utero* aux souris de la première génération (F0), persistait aux générations suivantes, et ce malgré l'absence de nouvelle exposition *in utero* à de l'AMH exogène. Les symptômes reproductifs et métaboliques avaient même tendance à s'accroître au fil des générations. Des modifications épigénétiques, surtout de type « hypo-méthylations » habituellement marqueurs d'une augmentation d'activité du promoteur, de certains de gènes en lien avec des troubles métaboliques ou de l'inflammation ont été mis en évidence dans les souris de la troisième génération, confirmant que la surexpression de l'AMH pouvait jouer un rôle dans la programmation *in utero* du SOPK (Mimouni *et al.*, 2021). Des modifications épigénétiques du même type ont également été décrites, dans le modèle murin, à la troisième génération après exposition aux androgènes pendant la grossesse à la première génération (Risal *et al.*, 2019). Dans l'espèce humaine, ces mêmes modifications ont également été retrouvées chez des mères et leurs filles atteintes de SOPK (Risal *et al.*, 2019; Mimouni *et al.*, 2021). De plus, des modifications épigénétiques de type hypo-méthylation ont été également décrites, en particulier sur les récepteurs aux androgènes, chez des filles de femmes avec SOPK et renforcent l'hypothèse épigénétique de transmission du SOPK (Echiburú *et al.*, 2020) (**Figure 14**).

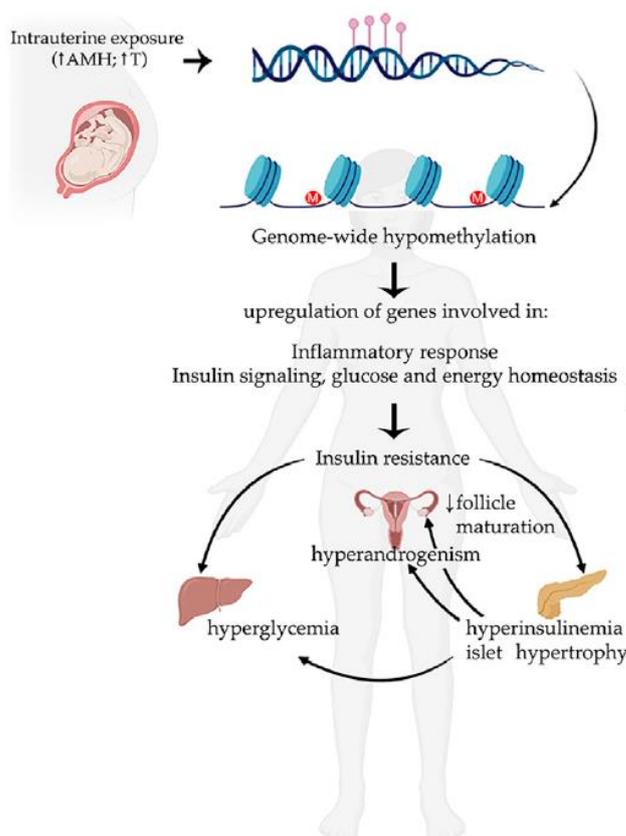


Figure 14 : Transmission épigénétique transgénérationnelle du SOPK. Suite à l'exposition *in utero* (intrauterine exposure) à des facteurs comme des taux élevés d'AMH ou de testostérone (T), des modifications épigénétiques de type hypo-méthylation ont été mises en évidence. Celles-ci ont pour effet une stimulation de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, la réponse à l'insuline et l'homéostasie glucidique et énergétique. Ces modifications peuvent conduire à une insulino-résistance qui peut favoriser l'hyperandrogénie et le défaut de maturation folliculaires caractéristiques du SOPK (Mimouni *et al.* 2021)

Chez la femme non atteinte d'un SOPK le taux d'AMH sérique décroît pendant la grossesse de façon progressive pour retrouver son niveau initial dans les premiers 6 mois du post-partum (Nelson *et al.*, 2010; Kuijper *et al.*, 2013; Pankhurst *et al.*, 2016b, 2020; McCredie *et al.*, 2017) et le pourcentage des différentes formes moléculaires de l'AMH ne se modifie pas pendant la grossesse (Pankhurst *et al.*, 2016b). Cette baisse du taux d'AMH est secondaire à l'hypogonadisme hypergonadotrope physiologique de la grossesse et à la sécrétion de stéroïdes par le placenta responsable d'une inhibition du recrutement folliculaire (Kuijper *et al.*, 2013; Piltonen *et al.*, 2019) même si un recrutement folliculaire minimal semble exister y compris pendant la grossesse (McCredie *et al.*, 2017).

Chez les femmes avec SOPK, des études transversales, ou longitudinales partielles sans suivi exhaustif des patientes pendant la grossesse, ont mis en évidence que l'AMH sérique restait plus élevée que chez les femmes témoins au deuxième trimestre de la grossesse et au moment de l'accouchement (Köninger *et al.*, 2018; Tata *et al.*, 2018; Detti *et al.*, 2019; Piltonen *et al.*, 2019; Valdimarsdottir *et al.*, 2019). En fin de gestation, l'injection de l'AMH chez la souris gestante provoquait l'apparition du phénotype SOPK chez les petits (Tata *et al.*, 2018), et pourrait donc participer à l'héritabilité du syndrome dans l'espèce humaine. Cependant, pour le moment, aucune étude de suivi longitudinal de patientes avec SOPK et de patientes témoins tout au long de la grossesse n'a été réalisée.

Par ailleurs dans l'étude de Tata *et al.*, seules les femmes minces avec un SOPK présentaient, au deuxième trimestre de la grossesse, des taux d'AMH plus élevés que les témoins ; aucune différence de taux d'AMH circulant n'était retrouvée chez les femmes obèses entre SOPK et témoins (Tata *et al.*, 2018). Enfin, l'étude de Piltonen *et al.* (Piltonen *et al.*, 2019), rapporte des taux d'AMH maternels plus élevés chez les femmes qui portent un enfant de sexe masculin que chez celles portant un enfant de sexe féminin mais, dans cette étude, la proportion de femmes avec SOPK était plus importante chez les femmes enceintes de fœtus masculin que chez celles enceintes d'un fœtus féminin. D'autres auteurs discutent l'idée que le sexe du fœtus influencerait les taux de stéroïdes maternels. Ainsi, Caanen *et al.* retrouvent une différence selon le sexe fœtal : les taux d'androgènes maternels étant significativement plus élevés chez les patientes avec SOPK uniquement quand elles portent un fœtus de sexe féminin (Caanen *et al.*, 2016; Piltonen *et al.*, 2019). A l'inverse, d'autres auteurs ne retrouvent pas de différence des taux d'androgènes et d'AMH maternels chez des patientes SOPK selon le sexe fœtal (Vanky and Carlsen, 2012).

Le lien entre AMH et androgènes pendant la gestation paraît très important et Piltonen *et al.* ont rapporté une corrélation positive forte entre les taux d'AMH et d'androgènes à terme (Piltonen *et al.*, 2019). La plupart des femmes avec SOPK étant hyperandrogéniques pendant la grossesse, comme décrit précédemment, les travaux de Tata *et al.* chez la souris exposée *in utero* à l'AMH soulèvent l'hypothèse que cette hyperandrogénie gravidique pourrait être secondaire à une action de l'AMH par inhibition de l'expression ou de l'activité de certaines enzymes de la stéroïdogénèse placentaire, en particulier l'aromatase (Cyp19A1) (Tata *et al.*, 2018).

h/ Stéroïdogénèse placentaire chez les femmes avec SOPK et place de l'AMH

Dans l'espèce humaine, la placentation est dite « hémochoriale » et ce type de placentation est associé à une forte stéroïdogénèse. Le trophoblaste et, plus particulièrement, le syncytiotrophoblaste est un site actif de stéroïdogénèse, grand producteur de progestérone, d'androgènes, d'œstrone et d'œstradiol. Pour la synthèse des hormones stéroïdes une coordination étroite au sein de l'unité fœto-materno-placentaire est nécessaire. En effet, le placenta ne possède pas toutes les enzymes permettant la synthèse des hormones stéroïdes et une collaboration avec les surrénales fœtales et maternelles est nécessaire (**Figure 15**).

Chez les femmes avec SOPK, qui présentent, pendant la grossesse, des taux d'androgènes circulants plus importants que ceux des femmes témoins, une diminution de l'activité enzymatique de l'aromatase (CYP19A1) a été rapportée (Maliqueo *et al.*, 2013), mais pas de modification de l'expression du gène (Maliqueo *et al.*, 2015), au contraire de ce qui a été décrit dans le modèle murin (Tata *et al.*, 2018). L'activité de la 3 β HSD1 placentaire est augmentée chez les patientes avec SOPK (Maliqueo *et al.*, 2013) alors que son expression est diminuée dans le placenta du modèle murin (Tata *et al.*, 2018) et n'est pas modifiée dans le placenta humain (Maliqueo *et al.*, 2015). Dans ce dernier travail de Maliqueo *et al.*, seule l'expression de la CYP 11A1, parmi les gènes des enzymes de la stéroïdogénèse placentaire, était retrouvée diminuée dans le placenta de femmes avec SOPK, les profils d'expression des gènes n'étant pas différents selon les phénotypes des femmes avec SOPK (Maliqueo *et al.*, 2015). Ainsi, chez l'Homme, du fait de ces dérégulations d'activités enzymatiques placentaires, on assisterait à une augmentation de production d'androgènes par une augmentation de l'activité de la 3 β HSD1 et à un défaut relatif de conversion de ceux-ci en œstrogènes. En effet,

corroborant cette hypothèse, il a été démontré que des fœtus féminins de femmes ayant un défaut du gène de l'aromatase (CYP 19A1) ou de la SHBG, qui sont de rares conditions à l'origine d'une androgénisation, développent également un SOPK plus tard dans la vie (Morishima *et al.*, 1995). Enfin, très récemment, une autre équipe a quantifié l'expression protéique différentielle de certaines enzymes de la stéroïdogénèse dans le placenta (17 β HSD, CYP 19A1) par une approche immunohistochimique et n'a pas mis en évidence de différence entre femmes avec SOPK et témoins (Sun *et al.*, 2020), mais plutôt une tendance à une augmentation de l'expression protéique de ces deux enzymes.

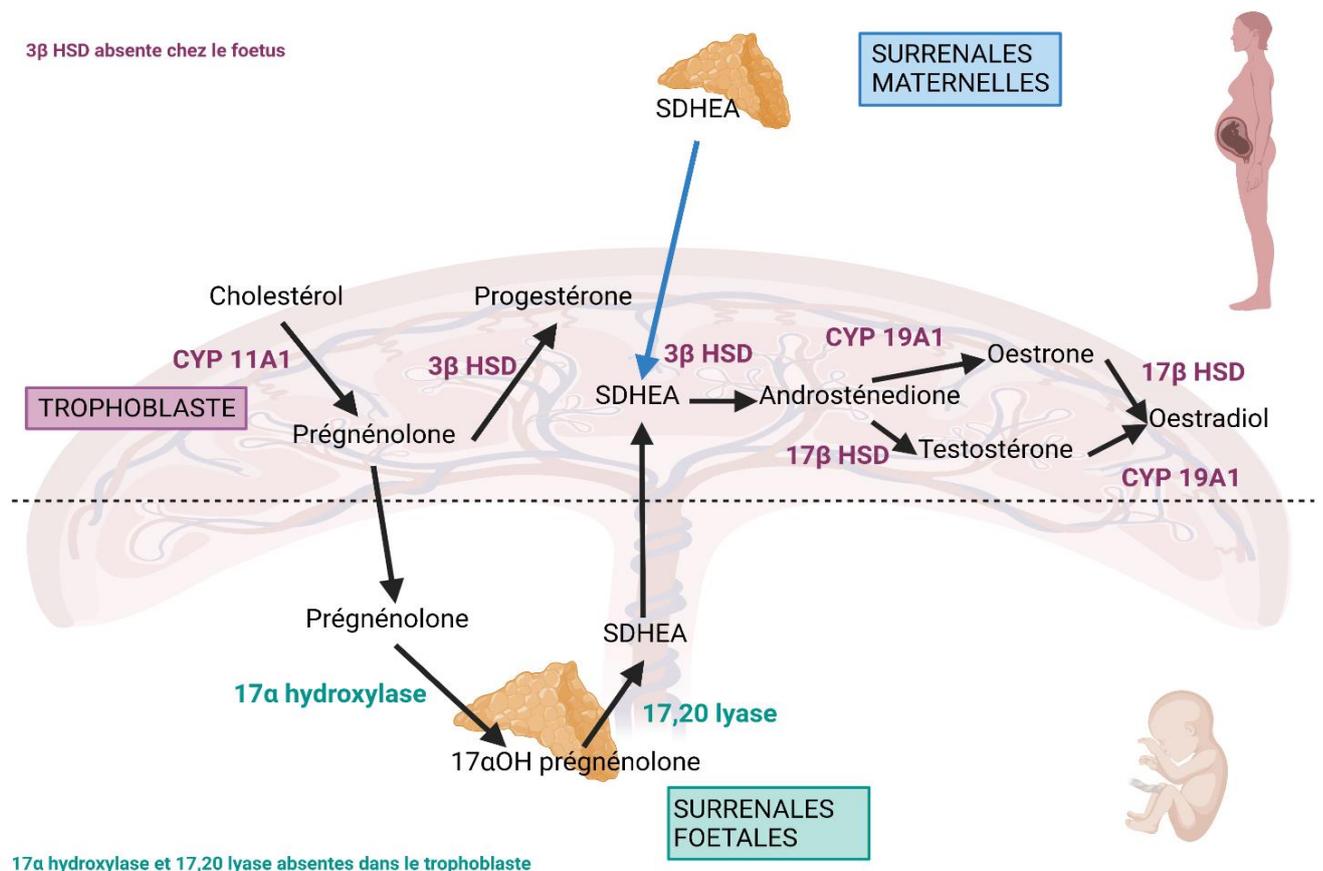


Figure 15 : Stéroïdogénèse de l'unité fœto-placentaire. Pour la synthèse des hormones stéroïdes une coordination étroite au sein de l'unité fœto (en vert) -materno (en bleu) -placentaire (en rouge) est nécessaire. Au sein du trophoblaste, sous l'action du Cytochrome P450 sous famille 11 type A1 (CYP 11A1 = CYP 450 SCC (side chain cleavage)) le cholestérol est transformé en prégnénolone. Au sein du trophoblaste sous l'action de la 3 β hydroxy-stéroïde déshydrogénase (3 β HSD), la prégnénolone est transformée en progestérone. Par ailleurs la prégnénolone passe la barrière placentaire pour être métabolisée en 17 – alpha-hydroxy prégnénolone (17 α OH Prégnénolone) sous l'action de la 17 α hydroxylase. Celle-ci est ensuite métabolisée en Sulfate de Déhydroépiandrosterone (SDHEA) qui pourra être métabolisé dans le compartiment placentaire en androsténedione par la 3 β HSD. L'androsténedione pourra ensuite soit être convertie en œstrone par le Cytochrome P 450 sous famille 19 type A1 (CYP19A1= aromatase) ou en testostérone par la 17 β hydroxy-stéroïde déshydrogénase (17 β HSD). L'œstradiol sera obtenu à partir de l'œstrone via l'action de la 17 β HSD ou à partir de la testostérone via l'action du CYP 19A1. Créé avec BioRender.com

Récemment, l'expression de l'AMHR2 dans le placenta a été décrite dans différentes espèces, dont l'espèce humaine (Novembri *et al.*, 2015; Stojsin-Carter *et al.*, 2017; Tata *et al.*, 2018). Concernant l'expression de l'AMH les résultats sont discordants : détecté dans l'espèce humaine mais pas chez le bovin (Novembri *et al.*, 2015; Stojsin-Carter *et al.*, 2017).

De plus, des différences dans les expressions et sécrétions des gènes, protéines et stéroïdes de l'unité fœto-placentaire ont été montrées en fonction du sexe fœtal (Clifton, 2010; Osei-Kumah *et al.*, 2011; Yeganegi *et al.*, 2011; Saif *et al.*, 2014). Dans l'étude la plus récente, menée en 2015, Novembri *et al.*, ont recherché, par une approche en qRT-PCR, si, dans l'espèce humaine, une différence d'expression de l'AMH ou de son récepteur existait au niveau placentaire en fonction du sexe fœtal. Aucune différence n'a été mise en évidence (Novembri *et al.*, 2015). En revanche, ils ont démontré par Immuno-Histo-Chimie une colocalisation de l'AMH et de l'AMHR2 au niveau du syncytiotrophoblaste renforçant l'hypothèse d'une action possible de cette hormone sur le placenta.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

PREMIERE PARTIE

Comme précédemment décrit, le SOPK est la cause la plus fréquente de troubles de l'ovulation chez la femme et touche 5 à 20 % de la population féminine mondiale. Il est caractérisé par 2 des 3 symptômes suivants : une hyperandrogénie, un trouble du cycle, un excès folliculaire. Mais toutes les femmes avec SOPK n'ont pas le même phénotype. Certaines sont minces, d'autres obèses, avec un hyperinsulinisme ou non, certaines présentent une hyperandrogénie ou une LH augmentée de base, d'autres non. La physiopathologie du SOPK mais également le pourquoi de ces différents phénotypes restent inconnus.

L'AMH, sécrétée chez la femme par les cellules de la granulosa et dont le taux sérique est très élevé chez les femmes avec SOPK, pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie du SOPK en participant, en particulier, aux troubles de la folliculogénèse caractéristiques du syndrome.

De plus, les femmes minces avec un SOPK ont plus fréquemment une AMH et une LH de base plus élevées que les femmes avec SOPK en surpoids ou obèses. Ceci est à mettre en perspective avec des découvertes récentes de notre équipe chez la souris : les neurones à GnRH, porteurs du récepteur spécifique de l'AMH, sont régulés par l'AMH et induisent une hyperactivité du neurone à GnRH à l'origine d'une hypersécrétion de LH par l'antéhypophyse. Ainsi, chez certaines femmes avec SOPK, l'AMH élevée pourrait peut-être jouer un rôle central sur le neurone à GnRH. Cependant, toutes les formes moléculaires de l'AMH ne peuvent pas agir directement sur ce neurone.

En effet, l'AMH existe dans le sérum sous une forme non clivée inactive appelée proAMH et des formes clivées, biologiquement actives, appelées AMH_{N,C} (constituée des fragments N-terminal et C-terminal, associés de façon non covalente) et AMH_C (fragment C-terminal), mais ce dernier n'est pas présent seul dans le sérum. Seul le fragment C-terminal de l'AMH peut passer la barrière hémato-encéphalique pour agir sur les neurones à GnRH.

Ainsi, des différences de ratio de chaque forme moléculaire de l'AMH dans le sérum pourraient être à l'origine de différentes actions de l'AMH et participer aux différents phénotypes rencontrés dans la population avec SOPK. Ce ratio a, en effet, déjà été montré comme différent dans différentes populations (filles, garçons, femmes, hommes, femmes

enceintes...). De plus, en se basant sur des études existantes ayant montré qu'un traitement in vitro par testostérone ou LH augmentait le clivage de l'AMH, nous avons émis l'hypothèse que l'hyperandrogénie et le taux élevé de LH, parfois rencontrés chez les patientes avec SOPK, pouvait conduire à un taux circulant de forme clivée, active, d'AMH plus élevé chez ces femmes.

Notre première hypothèse est donc que le taux sérique d'AMH clivée (forme active de l'AMH), ou sa proportion, pourrait être plus important(e) chez les femmes avec SOPK que chez les témoins. Ils pourraient également être différents en fonction de certains phénotypes de SOPK et participer à l'origine de ceux-ci. Ainsi, un taux d'AMH clivée plus important pourrait favoriser, par une action centrale, une hyperactivation du neurone à GnRH dans certaines populations à l'origine d'une hypertonie de la LH, et secondairement d'une hyperandrogénie, en particulier chez les femmes minces avec SOPK présentant habituellement des taux de LH plus élevés. Une autre hypothèse serait que, par une action périphérique sur l'ovaire, la proportion d'AMH clivée soit au contraire plus importante chez les femmes souffrant d'une dysovulation, en particulier chez les femmes obèses avec SOPK.

Le premier objectif de ce travail était donc de déterminer si les différentes formes moléculaires de l'AMH, actives et inactives, ou leur distribution relative, différaient entre les femmes selon leur statut de SOPK ou leur indice de masse corporel (IMC), de rechercher des corrélations avec certains traits phénotypiques (hyperandrogénie, hypertonie de la LH...) et d'étudier si les différences entre ces proportions d'isoformes de l'AMH étaient dues à une augmentation de clivage au niveau du sérum ou du liquide folliculaire.

DEUXIEME PARTIE

Ainsi que noté en introduction, il est actuellement décrit que 35 à 70 % des filles de femmes avec SOPK vont développer un SOPK après la puberté (Teede *et al.*, 2018; Dumesic *et al.*, 2020). Les gènes (ou groupes de gènes) actuellement identifiés comme ayant un lien avec le SOPK ne peuvent expliquer que moins de 10 % de cette héritabilité. La principale hypothèse actuelle à l'origine de l'héritabilité du syndrome serait environnementale/épigénétique. Selon cette hypothèse, l'exposition à certains facteurs *in utero* favoriserait l'émergence du SOPK.

Des travaux récents de notre équipe sur la souris (Tata *et al.*, 2018) ont mis en évidence que lorsque l'on injecte de l'AMH (la forme C-terminale active ou proAMH) à des souris gestantes en intra-péritonéal en fin de gestation, les souriceaux femelles présentent un phénotype de SOPK (hyperandrogénisation à la naissance puis hyperandrogénie à l'âge adulte, hyperpulsatilité de la LH et troubles du cycle). Puisque l'AMH ne peut pas passer la barrière placentaire, cette action de l'AMH serait donc plutôt indirecte, par exemple (1) en modulant l'activité du neurone à GnRH et la sécrétion de LH maternelle pouvant conduire à une hyperandrogénie ovarienne ou (2) en inhibant l'aromatase placentaire (comme elle le fait sur l'aromatase ovarienne) provoquant une modification de la stéroïdogénèse placentaire à l'origine d'une hyperandrogénie placentaire ayant une action directe sur le fœtus (Tata *et al.*, 2018). En effet, chez le rongeur mais également chez la guenon ou la brebis, l'exposition *in utero* d'un fœtus féminin à une hyperandrogénie exogène provoque l'apparition d'un phénotype SOPK (Foecking *et al.*, 2005; Filippou and Homburg, 2017). Par ailleurs, des travaux encore plus récents, sur le modèle murin, ont mis en évidence que les dérégulations hormonales, reproductives et métaboliques provoquées par une exposition initiale à de l'AMH *in utero* à la première génération pouvaient être transmises et aggravées aux générations suivantes par un effet épigénétique (Mimouni *et al.*, 2021), comme cela a été montré également dans un modèle murin exposé *in utero* aux androgènes à la première génération (Risal *et al.*, 2019).

Chez la femme, il est actuellement bien connu que l'AMH sérique diminue pendant la grossesse du fait, *a priori*, de l'hypogonadotropisme physiologique qu'elle engendre (Lutterodt *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2010; Tata *et al.*, 2018; Piltonen *et al.*, 2019). Cette baisse est maximale au troisième trimestre de la grossesse puis le taux d'AMH réaugmente de façon progressive après l'accouchement pour retrouver son taux antérieur à la grossesse dans les 6 mois du post-partum (Pankhurst *et al.*, 2020). Concernant les formes moléculaires de l'AMH, une seule étude dans une population témoin n'a pas montré de variation du ratio de ces différentes formes actives ou non, en fonction du terme de la grossesse (Pankhurst *et al.*,

2016b). Chez les femmes avec SOPK, des études transversales ou longitudinales partielles ont montré un taux d'AMH plus élevé aux deuxième et troisième trimestres de la grossesse chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins (Königer *et al.*, 2018; Tata *et al.*, 2018; Detti *et al.*, 2019; Piltonen *et al.*, 2019; Valdimarsdottir *et al.*, 2019). Aucun suivi dynamique complet de l'AMH en cours de grossesse n'a été réalisé.

Les études sur la stéroïdogénèse placentaire humaine sont peu nombreuses et vont dans le sens d'une modulation d'activité ou d'expression de certaines enzymes de la stéroïdogénèse, pouvant favoriser une hyperandrogénie chez les patientes avec SOPK (Maliqueo *et al.*, 2013, 2015; Novembri *et al.*, 2015).

Notre hypothèse est que, dans le sérum, l'AMH, et en particulier sa forme clivée, active, reste plus élevée chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins et ce jusqu'au dernier trimestre de la grossesse, période à laquelle l'injection de l'AMH chez la souris gestante provoquait l'apparition du phénotype SOPK chez les petits (Tata *et al.*, 2018). L'AMH pourrait, en restant plus élevée chez les patientes avec SOPK pendant la grossesse, participer à l'héritabilité du syndrome dans l'espèce humaine par une action *in utero* sur le fœtus. Cette action de l'AMH pourrait s'exercer en favorisant un état d'hyperandrogénie *in utero* via une modification de la stéroïdogénèse placentaire, avec, en particulier, une diminution de certaines enzymes comme l'aromatase, ou via une action centrale sur l'hypothalamus maternel qui conduirait à une exposition fœtale à des taux élevés d'androgènes et possiblement à des modifications épigénétiques prédisposant à la survenue du syndrome et de ses complications.

Pour tester ces hypothèses, nous avons donc pour objectif de suivre et de comparer l'évolution du taux plasmatique d'AMH, de ses formes moléculaires et de différentes hormones stéroïdes, en particulier les androgènes, entre des populations de femmes enceintes avec ou sans SOPK avant et tout au long de la grossesse de façon longitudinale. Nous avons aussi pour objectif d'étudier les modifications d'expression placentaires de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, en particulier l'aromatase, possiblement secondaires à cette exposition à des taux plus élevés d'AMH sérique.

PARTIE 1 :

LES FORMES MOLECULAIRES DE L'AMH, UNE
PROPORTION DIFFERENTE SELON LES STATUTS
SOPK OU METABOLIQUE ?

Mise en contexte

Pour répondre à notre premier objectif, une étude des formes moléculaires de l'AMH dans le sérum et dans le liquide folliculaire de femmes SOPK et témoins, obèses et de poids normal, a donc été réalisée de 2016 à 2019. Ces études ont abouti à un article publié inséré ci-dessous et en annexe (Annexe 1).

Résumé en français

Question de travail : Est-ce que la distribution relative des isoformes de l'AMH dans le sérum et dans le liquide folliculaire diffère d'une patiente à l'autre en fonction de l'IMC ou du statut SOPK ?

Matériel et Méthodes : Des femmes obèses et de poids normal, 70 avec SOPK et 37 non atteintes de SOPK, ont été sélectionnées pour une première étude sur le sérum entre 2016 et 2018. Entre 2018 et 2019, des femmes obèses (N = 19) et de poids normal (N = 20), avec ou sans SOPK en cours de processus de FIV ont été incluses dans la deuxième étude sur le liquide folliculaire. L'AMH totale (somme de la proAMH, forme inactive, et de l'AMH_{N,C}, forme bioactive) et la proAMH ont été mesurées dans les sérums et liquides folliculaires avec une technique automatisée. L'index de proAMH ($API = (proAMH/AMH\ totale) \times 100$) a été calculé comme marqueur inverse de conversion de la proAMH en AMH_{N,C}.

Résultats : L'API n'était pas significativement différent entre les femmes avec SOPK et les femmes témoins tandis qu'au sein de chaque sous-groupe (SOPK ou témoin), les femmes obèses avaient un API plus faible que les femmes de poids normal. En regroupant les femmes avec SOPK et les témoins, un API plus faible a été mis en évidence chez les femmes obèses que chez les femmes de poids normal, suggérant une conversion plus importante de la proAMH en AMH_{N,C}. L'API dans le sérum était corrélé de façon significative avec les paramètres métaboliques. Dans le liquide folliculaire, l'API n'était pas différent entre les femmes obèses et les femmes de poids normal, quel que soit le statut SOPK ou non, et était significativement plus élevé que dans le sérum prélevé au même moment chez la même patiente.

Conclusions : La proportion de la forme inactive de l'AMH dans le sérum est plus élevée chez les femmes de poids normal que chez les femmes obèses. Ce n'est pas le cas dans le liquide folliculaire. Le statut SOPK ne change pas cette proportion. La conversion de la proAMH inactive en sa forme clivée active semble intervenir en extra-ovarien et être exacerbé chez les femmes obèses.

The proportion of cleaved anti-Müllerian hormone is higher in serum but not follicular fluid of obese women independently of polycystic ovary syndrome

Maëliiss Peigné¹, Pascal Pigny^{1,4}, Michaël W. Pankhurst⁵, Elodie Drumez^{6,7}, Anne Loyens¹,
Didier Dewailly^{1,3}, Sophie Catteau-Jonard^{1,3*}, Paolo Giacobini^{1*§}

Reproductive Biomedicine Online

Volume 41 Issue 6 2020

doi:10.1016/j.rbmo.2020.07.020

Structured Abstract

Study question: Does the relative distribution of anti-Müllerian hormone (AMH) isoforms differ between patients depending on their body mass index (BMI) and polycystic ovary syndrome (PCOS) status in serum and follicular fluid?

Design: Obese and normal weight patients (PCOS [n=70]; non-PCOS:[n=37]) were selected for this case-control study in the serum. Between 2018 and 2019, obese (n = 19) and normal weight (n = 20) women with or without PCOS who were receiving IVF treatment were included in the follicular fluid study. The bio-banked serums and follicular fluids were tested for totalAMH (proAMH and AMH_{N,C} combined) and proAMH using an automatic analyzer. The AMH prohormone index (API= [proAMH]/[total AMH]x100) was calculated as an inverse marker of conversion of proAMH to AMH_{N,C}, with only the latter isoform that could bind to the AMH receptor-complex.

Results: The API was not significantly different between controls and women with PCOS, whereas obese women had a lower API versus their normal weight counterparts. Grouping PCOS and controls, a lower API was found in obese versus normal weight women, suggesting a greater conversion of proAMH to AMH_{N,C}. The API in the serum was significantly correlated with metabolic parameters. In the follicular fluid, API was not different between obese and normal weight women independently of PCOS and is higher than in the concomitant serum.

Conclusions: The proportion of inactive form of AMH in the serum is higher in normal weight versus obese women but not in the follicular fluid, independently of PCOS. The conversion of proAMH into the cleaved isoform is likely occurring in extra-ovarian tissues and exacerbated in obese individuals.

Keywords: PCOS; AMH; molecular forms; BMI; obesity; follicular fluid

Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complex reproductive endocrine disorder, affecting up to 20% of women of reproductive age and representing the primary cause of anovulatory infertility worldwide (Teede *et al.*, 2018). In about 50% of cases, PCOS associates with metabolic disturbances, such as obesity, type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and other comorbidities (Dumesic *et al.*, 2015; Escobar-Morreale, 2018). Moreover, obesity itself increases the symptoms of PCOS such as ovulation disorders or hyperandrogenism.

A frequent hallmark found in women with PCOS, is an elevation of Anti-Müllerian hormone (AMH) serum levels, which have been reported to be 2-3-fold higher than in women with healthy ovaries (Cook *et al.*, 2002; Pigny *et al.*, 2003). The severity of the PCOS phenotype correlates with AMH production, which is higher in anovulatory than in ovulatory PCOS patients (Pellatt *et al.*, 2007; Catteau-Jonard *et al.*, 2012; Abbara *et al.*, 2019). Clinically observed correlations between enhanced basal levels of AMH and PCOS have led to a potential physiological role for AMH in “follicular arrest” in women with PCOS (Dewailly *et al.*, 2014a). In this pathology, enhanced numbers of primary and small secondary follicles secrete abnormally high levels of AMH, that associates with excess androgen production/secretion and leading to arrested follicular maturation (Dewailly *et al.*, 2014a).

AMH is a glycoprotein synthesized as a homo-dimeric prohormone of 140 kDa (composed of two monomers of 70 kDa), which undergoes a proteolytic cleavage at monobasic sites to become biologically active (Pepinsky *et al.*, 1988; di Clemente *et al.*, 2010). The cleavage of AMH gives rise to a 110 kDa N-terminal homodimer formed by two 57 kDa subunits (AMH_N) and a 25 kDa active C-homodimer composed of two identical 12.5 kDa (AMH_C) subunits. These 2 homodimers remain associated in a non-covalent complex (AMH_{N,C}) (Pepinsky *et al.*, 1988; Nachtigal and Ingraham, 1996). Although having no intrinsic activity, AMH_N has the role of amplifying the biological activity of the AMH_C (Wilson *et al.*, 1993). AMH_{N,C} and its pro-hormone (proAMH) are found in blood but there is little evidence for the presence of free AMH_C (Pankhurst and McLennan, 2013). This suggests that circulating cleaved AMH_{N,C} levels represent the receptor-competent isoform available for a hormonal function in a variety of tissues and organs expressing the exclusive binding- receptor AMHR2 (Barbotin *et al.*, 2019).

Several studies point to AMH as a useful marker for the diagnosis of PCOS; however, challenges to the use of AMH to diagnose PCOS have been fully reviewed in Teede *et al.* 2018 (Teede *et al.*, 2018). Abbara *et al.* (Abbara *et al.*, 2019) recently suggested that AMH has potential as a biomarker for diagnosis of PCOS, outperforming antral follicles count, and

greater elevations in AMH were associated with a more certain diagnosis of PCOS. However, due to the variability in levels using first-generation and less reliable assays, and the lack of an international standard, AMH has not yet been adopted as part of the diagnostic criteria for PCOS (Teede *et al.*, 2018).

In recent years, novel approaches and analytical assays have been used (Pankhurst *et al.*, 2017; Wissing *et al.*, 2019), which aim to determine whether the ratios of proAMH or AMH_{N,C} in serum are altered in women with PCOS relative to women without PCOS, and to understand if different AMH-related isoforms can be used to predict PCOS. The results of those studies, however, are conflicting, either reporting differences in the mean proAMH-AMH_{N,C} ratio in the PCOS group compared with the unaffected control group (Pankhurst *et al.*, 2017) or reporting no differences in the relative distribution of the AMH isoforms between those groups (Wissing *et al.*, 2019). We hypothesized that part of the discrepancies could be due to the heterogeneity of the disorder and that stratifying women with and without PCOS based on their metabolic phenotype (body mass index [BMI]) could better help to pin-point eventual differences in AMH cleavage. These difference in AMH cleavage could lead to relative higher levels of active AMH in the serum which could contribute to the existence of different PCOS phenotypes.

The aims of this study were, therefore, to determine if the relative distribution of AMH isoforms differ from one patient to another depending on their BMI and PCOS status, and to investigate whether differences in the proportions of AMH isoforms are caused by increased proAMH cleavage occurring in the follicular fluid or in the serum.

Materials and Methods

Population for early follicular phase serum study

Patients referred to our department at an academic hospital for hyperandrogenemia, oligo-anovulation, infertility, or all of three, were identified from a database that included clinical, hormonal and ultrasound features, which were consecutively recorded between January 2014 and December 2018 . A total of 70 women with PCOS (42 obese; BMI ≥ 30 kg/m², and 28 normal weight; BMI ≤ 25 kg/m²) and 37 controls (16 obese and 21 normal weight) were selected retrospectively, as described below. Patients were included in the PCOS group according to a modified Rotterdam classification (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group, 2004), i.e., presence of at least 2 out of the 3 following items: -1)

hyperandrogenism (clinical or biological; as previously described (Peigné *et al.*, 2018); -2) oligo-anovulation, i.e. oligomenorrhea or amenorrhea; -3) presence of Polycystic Ovarian Morphology at ultrasound, with an ovarian area 5.5 cm² or greater, a follicle number per ovary of 19 or more, or both, according to our in-house thresholds, as previously reported (Jonard *et al.*, 2005; Dewailly *et al.*, 2011).

Controls were referred to our department for infertility caused by tubal, sperm abnormality, or both. None of these women had any component of the Rotterdam classification: they had regular cycles, no hyperandrogenism and normal ovaries at ultrasound. All medications known to affect metabolism, e.g. metformin, or ovarian function, e.g. oral contraceptive pill, had to be stopped at least 3 months before blood tests and ultrasound.

Investigations

During the medical examination, age, height, weight, and waist circumferences were registered. Blood sampling was carried out in the early follicular phase, i.e. between cycle days 2 and 5; either spontaneous or induced by dydrogesterone. Immunoassay was used to measure FSH, estradiol, LH, total testosterone, fasting serum insulin levels using an automatic analyzer (Architect) (Abbott Laboratories Abbott Park, IL, USA). Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) levels were measured by immunoassay using the Immulite analyzer (Siemens, Munich, Germany). Androstenedione levels were determined by liquid chromatography-mass spectrometry. Low limit of quantitation and intra-/ inter-assay variation are specified in **Supplementary Table 1**.

| Analyte | Immunoassay platform | Limit of Quantification | Intra-Assay CV (%) | Inter-Assay CV (%) |
|---------------------------|------------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|
| FSH | Architect (Abbott Lab) | 0.2 UI/L | 2.6-3.3 | 3.3-4.2 |
| LH | | 0.1 UI/L | 1.7-3.6 | 2.4-4.4 |
| Estradiol | | 20 pg/ml | 1.4-6.4 | 1.8-7.4 |
| Total Testosterone | | 0.05 ng/ml | 2.0-5.1 | 2.8-5.2 |
| Insulin | | 1 mUI/L | 1.8-4.2 | 2.1-5.2 |
| SHBG | Immulite 2000 (Siemens) | 2 nmol/L | 2.3-5.3 | 4.0-6.6 |
| Androstenedione | LC MS MS | 0.023 ng/ml | 2.9-3.1 | 5.5-7.0 |
| AMH | Access Dxi (Beckman Coulter) | 0.47 pmol/L | 1-1.2 | 2.9-4.7 |

Supplementary Table 1: Low limits of quantification and intra-/ inter-assay variation of analytes

Biochemical tests (glucose, lipid levels) were carried out in the central biochemistry department of the hospital using routine assays on Roche analyzers.

Population for follicular fluid and concomitant serum study

Between October 2018 and January 2019, women undergoing IVF ovarian stimulation were included prospectively either in the obese (PCOS or control) or the normal weight group (PCOS or control). Selection criteria were identical to those described earlier. Follicular fluid collected after oocyte retrieval (as described below), and serum, retrieved at the last hormonal check-up (2-3 days before oocyte retrieval and frozen at -20° after hormonal analysis) were used for AMH measurements.

Follicular fluid samples

All follicles over 12 mm were retrieved during the oocyte retrieval procedure. After oocyte isolation for IVF procedure, follicular fluid was collected, centrifuged at 1680 g for 5 min to remove cells and frozen at -80° until analysis.

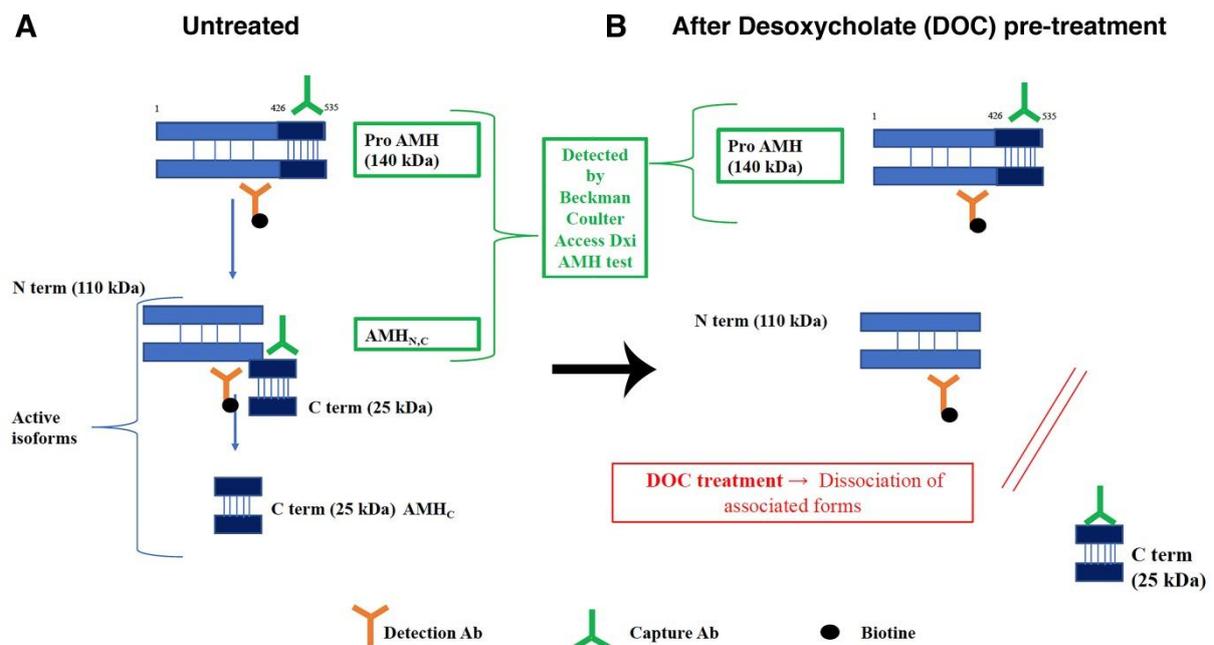
Anti-Müllerian hormone measurements

Routinely, fully automated Access Dxi sandwich chemoluminescent immunoassays (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) were used to measure serum AMH levels. The standard used in the Access Dxi assay is the human recombinant 140 kDa AMH. Its limit of detection is around 0.47 pmol/L (Pigny, unpublished) and its measurement range is 0.47-150 pmol/L (van Helden and Weiskirchen, 2015) (**Supplementary Table 1**). The Access Dxi assay used the same antibodies pair as the AMH Gen II ELISA: a capture antibody binding C-terminal part of AMH part and a detection antibody initially thought to be directed against the C-terminal of AMH but which also required the N-terminal part of AMH for correct detection (Kevenaar *et al.*, 2006; Pankhurst *et al.*, 2014). On the basis of these features, it can be assumed that the Access Dxi assay recognizes in the biological samples both the proAMH (uncleaved) and the AMH_{N,C} (receptor competent-active). To fix this point, four serums were spiked with 10-25 ng/ml of recombinant AMH_C (25 kDa, R&D Systems, MIS 1737). Results showed the absence of cross-reactivity of AMH_C in this assay (**Supplementary Table 2**).

| | AMH (pmol/L) serum 1 | AMH (pmol/L) serum 2 | AMH (pmol/L) PBS + BSA |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| Control | 20.4 | 26.0 | NA |
| + 10 ng/ml AMH _C | 19.4 | 25.6 | 0 |
| + 25 ng/ml AMH _C | 19.3 | 25.9 | 0 |

Supplementary Table 2: AMH_C Cross-reactivity test in AMH Dxi automatic analyzer (Beckman-Coulter)

It was, therefore, concluded that the only molecular AMH forms detected in the serum by Dxi Automatic analyzer were proAMH + AMH_{N,C} which were defined as total AMH (Supplementary Figure 1A).



Supplementary Figure 1: Specific assay for proAMH measurement.

Fully automated Access Dxi sandwich chemoluminescent immunoassay (Beckman Coulter) was used to measure serum AMH levels. It uses a capture antibody binding C-terminal part of AMH part and a detection antibody binding the N-terminal part of AMH. Based on these features, the Access Dxi assay recognizes both the proAMH and AMH_{N,C}, defined as total AMH (ProAMH + AMH_{N,C} = total AMH). A specific assay for proAMH measurement was built including a deoxycholate (DOC) treatment step of the serum which leads to the dissociation of the non-covalent link between N-terminal and C-terminal parts of AMH_{N,C} which prevents binding of the detection antibody. ProAMH is unaffected by the DOC treatment as the molecule is uncleaved (cf Supplementary Table 3).

Specific measurement of AMH molecular forms in serum and follicular fluid

A specific assay for proAMH measurement was built for Beckman Coulter Dxi automatic analyzer based on previous protocol designed with the AMH Gen II ELISA (Pankhurst and McLennan, 2016) and used in the left-over serum or follicular fluid of the patients. This experimental protocol included a deoxycholate (DOC) treatment step of the serum, which leads to the dissociation of the non-covalent link between N-terminal and C-terminal parts of AMH_{N,C}, which prevents binding of the detection antibody. ProAMH is unaffected by the DOC treatment as the molecule is uncleaved (**Supplementary Figure 1B**).

With the Gen II ELISA, the DOC treatment step was performed between the capture and detection steps, which is feasible in a manual assay but not possible with an automatic assay. Therefore, the samples were pre-treated before assaying AMH with the analyzer. On the basis of the study by Pankhurst and Mc Lennan (Pankhurst and McLennan, 2016), independent experiments were conducted to set up DOC concentration, incubation time and temperature. The final protocol is described below.

Two 150- μ L aliquots were made from each sample (bio-banked serum or follicular fluid, stored at -80 $^{\circ}$). Phosphate Buffered Saline (0.02 M, pH = 6.8, 37 $^{\circ}$ C) was added in one aliquot (control) whereas sodium deoxycholate in PBS at 37 $^{\circ}$ C (final concentration 0.23%, i.e. 2333 μ g/ml, corresponding to nearly 6000 times more than the endogenous serum DOC concentration) was added in the second aliquot. Aliquots were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 15 min before being spiked again with DOC or PBS solution and further incubated for 15 min at 37 $^{\circ}$ C. Final volumes of both aliquots were 300 μ L, which allow a direct measurement with the Beckman Coulter Access Dxi automatic analyzer. Control aliquot with PBS allows the measurement of total AMH in the sample, whereas aliquot with DOC treatment allows the measurement of proAMH only (**Supplementary Figure 1**).

The AMH prohormone index (API; (Pankhurst and McLennan, 2016)) was calculated as a surrogate marker of conversion of proAMH to AMH_{N,C}; $API = [\text{proAMH}]/[\text{total AMH}] \times 100$.

Validation of the specific proAMH assay

As previously described (Pankhurst and McLennan, 2013), an aliquot of recombinant human AMH was treated with furin to convert proAMH to AMH_{N,C}. By western blotting, it was observed that the untreated preparation (recombinant human AMH) mainly contains proAMH

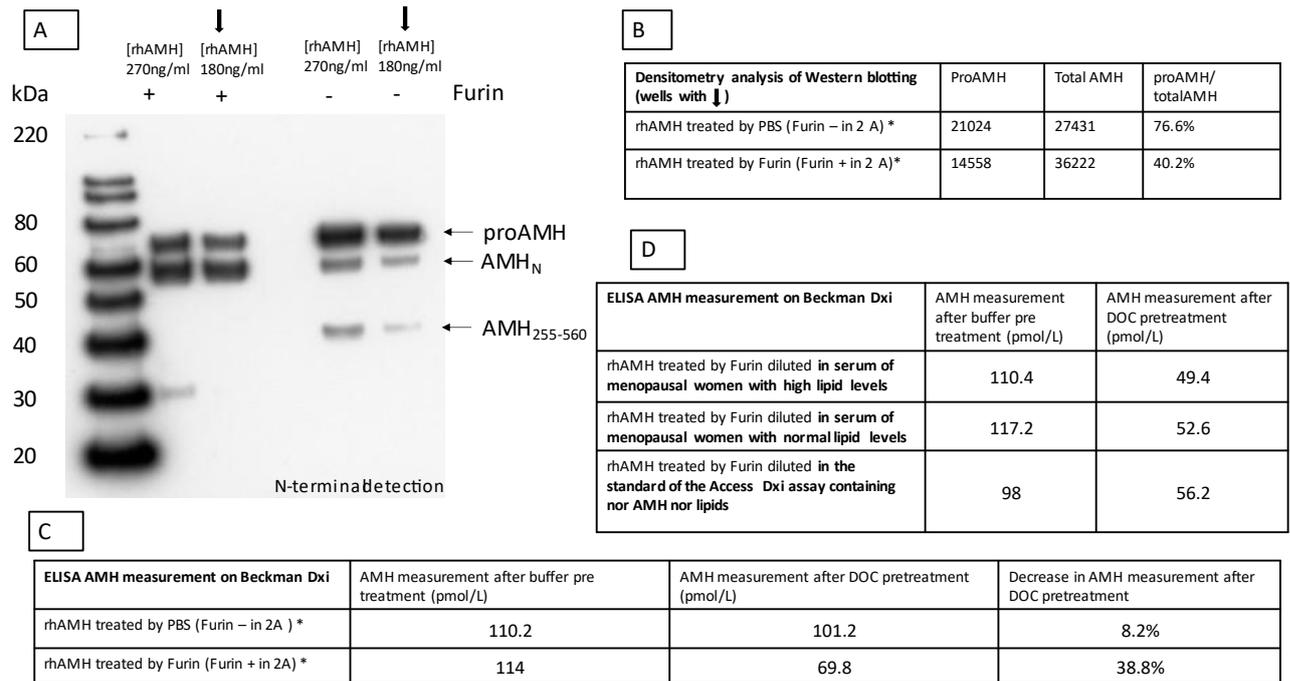
(around 77% after densitometric analysis) whereas the furin-treated preparation mainly contains AMH_{N,C} (around 60%) (**Supplementary Figure 2A-B**).

A total of 2- µg of proteins were loaded in each well composed of 4-12% Tris-glycine bisacrylamide gels at 120 volts for 15 min and then 150 volts for 75 min using the Xcell Surelock Mini-Cell system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Proteins were transferred to a 0.45-µm nitrocellulose membrane (Whatman PLC, Maidstone, UK) at 30 volts for 1 h 30 min on ice. Membranes were blocked in TBS-T (tri-buffered saline, 0.05% Tween 20) plus 5% milk for 1h at room temperature, followed by incubation with 0.1 ng/ml primary antibody (AF2748) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in TBS-T plus 5% bovine serum albumin overnight at 4°C. The next day, membranes were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (IRDye680 Donkey anti-goat immunoglobulin G antibody) (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) diluted at 1:10000 in TBS-T plus 5% milk for 1h at room temperature.

Finally, the membranes were incubated in SuperSignal West Pico PLUS (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) and revelation was carried out in a dark room using X-ray films. Fiji image analysis software was used for quantification.

Both preparations were measured after dilution using our specific assay for proAMH. As expected, addition of DOC induced a strong decrease of the AMH concentration in the furin-treated preparation. This demonstrated that DOC treatment reduces the assayed AMH value in a manner that is consistent with dissociation of the AMH_{N,C} complex (**Supplementary Figure 2C**). The assayed AMH values after DOC pre-treatment were not modified by the lipid profile of the dilution medium (serum of menopausal women with or without dyslipidemia, or in the standard of the Access Dxi assay, which does not contain AMH or lipids) (**Supplementary Figure 2D**).

No difference in total AMH levels measured with the Dxi Analyzer was observed between proAMH (either standard of the Access Dxi assay or recombinant AMH provided by Dr. Michael Pankhurst (Pankhurst and McLennan, 2016)) treated by DOC versus PBS buffer (**Supplementary Table 3**), thus confirming that proAMH is unaffected by the DOC treatment.



Supplementary Figure 2: DOC pretreatment dissociates AMH_{N,C}.

An aliquot of rhAMH was treated with furin to convert proAMH to AMH_{N,C} as previously described by Pankhurst and Mc Lennan (Pankhurst and McLennan, 2013). (A) Representative western blot of three experimental replicates: rhAMH treated with furin (+) or not (-), at different concentration (180 ng/ml or 270 ng/ml). Western blot was performed under reducing condition using primary antibody against a recombinant AMH propeptide, which predominantly maps to the N-terminal region (antigen: Leu19-Gln450, AF2748, R&D Systems). The location of proAMH, AMH_N and alternatively cleaved AMH (consisting of amino-acids 255-560 (AMH₂₅₅₋₅₆₀) are marked with arrows (←). (B) Densitometric analysis (a.u.: arbitrary units) of rhAMH (treated or not with furin) positive bands at 180 ng/ml (↓ in A) of the representative western blot presented in (A). (C) Both preparations were measured 3 times after dilution in the standard of the Access Dxi assay (without AMH nor lipids) using our specific assay for proAMH (values are mean of the 3 measurements). (D) AMH measurement of rhAMH treated by furin with and without DOC in different dilution mediums (serum of menopausal women with or without dyslipidemia, or in the standard buffer of the Access Dxi assay, which lacks AMH and lipids).

| proAMH (pmol/L) | Cal 0: 0 | Cal 2: 4.2 | Cal 3: 28.7 | Cal 4: 72.1 | Cal 5: 179.3 | rhAMH: 180 |
|--|----------|------------|-------------|-------------|--------------|------------|
| AMH measurement after buffer pretreatment (pmol/L) | 0 | 4.0 | 27.2 | 64.2 | 169.2 | 176 |
| AMH measurement after DOC pretreatment (pmol/L) | 0 | 3.8 | 26.4 | 64.6 | 157.4 | 163.6 |
| Decrease in AMH measurement after DOC pretreatment | 0% | 5% | 3% | 0% | 7% | 7% |

Supplementary Table 3: ProAMH is insensitive to DOC treatment.

Cal : standards of the Access Dxi assay (from Cal 0 to Cal 5) containing proAMH 140kDa, rhAMH provided by Pankhurst et al. (Pankhurst and McLennan, 2016) containing approximately 93 % of pro AMH (cf western blot in supplementary figure 2)

Statistical analysis

SPSS software 22.0 (SPSS Inc) (Chicago, IL, USA) was used for all statistical analyses. Results were expressed as medians, with fifth to 95th or 10th to 90th percentiles for continuous variables and by the frequencies and percentages for categorical variables. Comparisons between two independent groups were performed using the Mann-Whitney U test and between dependent groups (for paired comparison between follicular fluid and serum results) using the Wilcoxon signed rank test. Comparisons between four groups were conducted using the analysis of variance test (ANOVA test) with post-hoc pairwise comparisons between obese and normal weight controls, and obese and normal weight PCOS after applying Bonferroni correction. The correlations between the various parameters were expressed as Spearman's correlation coefficient (r). P <0.05 was considered to be significant and a r absolute value ≥ 0.4 was considered to be strong.

Ethics

For the first part of the study, all patients had previously provided informed consent for the use of their clinical, hormonal, ultrasound records and leftover serum. For the second part of the study, all patients provided informed consent for the use of their follicular fluid and leftover serum. The Institutional Review Board of the University Hospital granted unrestricted approval to the anonymous use of clinical, hormonal, ultrasound records and biologic collection from all patients (reference DC-2008-642, approved July 2009).

Results

Molecular forms of anti-Müllerian hormone in early follicular phase serum

One hundred and seven women were selected for this first part of the study: 70 women with PCOS (42 obese and 28 normal weight) and 37 controls (16 obese and 21 normal weight). The main clinical, hormonal, metabolic and ultrasound characteristics of the study population are presented in **Table 1** and **Supplementary Table 4**.

| | Control (N=37) | | PCOS (N=70) | | P value |
|-----------------------------|---|-----------------------------------|---|-----------------------------------|---------|
| | Normal weight (NC) N= 21 Med (5-95) | Obese (OC) N= 16 Med (5-90) | Normal weight (NP) N= 28 Med (5-95) | Obese (OP) N= 42 Med (5-95) | |
| Age (y) | 32.0 (22.4 - 38) c,d | 31.5 (25 – 35.3) c | 23 (16.3 - 33) a,b | 27 (19.1 - 38.0) a | <0.001 |
| Weight (kg) | 59.0 (47.1 - 65.4) b,d | 94.2 (81.0 – 129.1) a,c | 55.8 (44.4 - 72.7) b,d | 91.0 (74.0 - 123.5) a,c | <0.001 |
| BMI (kg/m ²) | 20.7 (16.4 - 24.9) b,d | 33.7 (29.0 – 43.85) a,c | 20.5 (17.1 – 25.9) b,d | 34.0 (30.0 - 42.95) a,c | <0.001 |
| Waist Circumference (cm) | 72.0 (58.5 - 78.9) b,d | 103.5 (79.5 – 133.2) a,c | 77 (62.8 - 100) b,d | 107.0 (95.1 - 129.9) a,c | <0.001 |
| Testosterone (ng/ml) | 0.22 (0.13 - 0.41) c,d | 0.31 (0.16 – 0.41) d | 0.38 (0.17 - 0.64) a | 0.45 (0.21 - 0.88) a,b | <0.001 |
| Androstendione (ng/ml) | 0.94 (0.5 - 1.58) c,d | 0.77 (0.42 – 1.72) c,d | 1.29 (0.74 - 2.87) a,b | 1.43 (0.64 - 3.04) a,b | <0.001 |
| Estradiol (pg/ml) | 36.0 (18.8-67.6) | 34.0 (17.0- 60.5) | 34.0 (16.2-94.4) | 42 (28.1-64.8) | 0.565 |
| LH (IU/L) | 4.1 (1.53 - 12.7) | 3.05 (1.5 – 5.5) c, d | 5.4 (2.4 - 17.2) b | 5.2 (2.2 - 11.7) b | 0.005 |
| FSH (IU/L) | 5.5 (3.5 -10.2) | 5.35 (4 – 7.67) | 5.1 (2.9 – 6.9) | 5.0 (3.2 - 8.2) | 0.135 |
| SHBG (pmol/L) | 70.4 (40.7 - 103.8) b,c,d | 36.3 (17.2 – 65.75) a | 47.5 (24.9 - 96.8) a,d | 28.8 (10.1 - 64.2) a, c | <0.001 |
| Fasting Glycaemia (g/L) | 0.77 (0.71 - 0.9) d | 0.86 (0.7 – 0.99) | 0.81 (0.69 - 0.94) | 0.85 (0.72 - 1.13) a | 0.013 |
| Fasting Insulinemia (mIU/L) | 3.4 (0.9 - 13.0) d | 5.6 (2.5 – 12.22) d | 4.6 (2.0 - 12.7) d | 11.6 (3.1 - 24.5) a,b,c | <0.001 |
| Total cholesterol (g/L) | 1.8 (1.1 - 2.4) | 1.66 (1.29 – 2.36) | 1.74 (1.19 - 2.6) | 1.89 (1.46 - 2.65) | 0.182 |
| HDL cholesterol (g/L) | 0.58 (0.38 - 0.77) b,d | 0.48 (0.32 – 0.61) a | 0.56 (0.376- 0.78) d | 0.45 (0.29 - 0.58) a,c | <0.001 |
| LDL cholesterol (g/L) | 1.03 (0.57 - 1.58) | 1.06 (0.66 – 1.59) | 0.98 (0.58 - 1.74) | 1.26 (0.78 - 1.81) | 0.183 |
| Triglycerides (g/L) | 0.59 (0.36 -1.42) d | 0.86 (0.44 – 1.65) | 0.65 (0.33 - 1.65) d | 1.1 (0.58 - 2.98) a,c | <0.001 |
| Total AFC both ovaries | 22 (8.5 - 35) c,d | 21 (6 – 30.1) c,d | 52 (14.2 - 123) a,b | 55 (24.3 - 99.0) a,b | <0.001 |

Table 1: Population characteristics in the early follicular phase serum study.

a: statistically different from normal weight control (NC); b: statistically different from obese control (OC); c: statistically different from normal weight women with PCOS (NP); d: statistically different from obese women with PCOS (OP).

| | 1 vs 2 NC vs OC | 1 vs 3 NC vs NP | 1 vs 4 NC vs OP | 2 vs 3 OC vs NP | 2 vs 4 OC vs OP | 3 vs 4 NP vs OP |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Age (y) | 1.0 | <0.001 | 0.01 | <0.001 | 0.081 | 0.055 |
| Weight (kg) | <0.001 | 1.0 | 0.01 | <0.001 | 0.288 | <0.001 |
| BMI (kg/m ²) | <0.001 | 1.0 | <0.001 | <0.001 | 1.0 | <0.001 |
| Waist Circumference (cm) | <0.001 | 0.481 | <0.001 | <0.001 | 0.854 | <0.001 |
| Testosterone (ng/ml) | 1.0 | 0.005 | <0.001 | 0.477 | 0.002 | 0.191 |
| Androstendione (ng/ml) | 1.0 | 0.011 | 0.001 | 0.037 | 0.005 | 1.0 |
| Estradiol (pg/ml) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| LH (IU/L) | 0.655 | 0.329 | 1.0 | 0.004 | 0.030 | 1.0 |
| FSH (IU/L) | 1.0 | 0.305 | 0.195 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| SHBG (pmol/L) | <0.001 | 0.006 | <0.001 | 0.419 | 0.213 | <0.001 |
| Fasting Glycaemia (g/L) | 0.215 | 1.0 | 0.038 | 0.521 | 1.0 | 0.114 |
| Fasting Insulinemia (mIU/L) | 0.770 | 1.0 | <0.001 | 1.0 | <0.001 | <0.001 |
| Total cholesterol (g/L) | 1.0 | 1.0 | 0.603 | 1.0 | 1.0 | 0.348 |
| HDL cholesterol (g/L) | 0.004 | 1.0 | <0.001 | 0.050 | 0.794 | <0.001 |
| LDL cholesterol (g/L) | 1.0 | 1.0 | 0.127 | 1.0 | 0.794 | 0.104 |
| Triglycerides (g/L) | 1.0 | 1.0 | <0.001 | 1.0 | 0.146 | <0.001 |
| Total AFC both ovaries | 1.0 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 1.0 |

Supplementary Table 4: p values for intergroup comparisons of patient's characteristics.

NC: normal weight control; OC: obese control; NP: normal weight PCOS; OP: obese PCOS

Total AMH and proAMH levels were higher in women with PCOS, independently of their metabolic features (BMI and insulin resistance, indirectly evaluated by waist circumference, SHBG levels and fasting insulinemia), compared with controls: respectively for total AMH (PCOS: 47.4pmol/l, 95%CI 26.5 to 133.5 versus controls:17.2pmol/l, 95%CI 7.8 to 35.7; $P < 0.001$) and proAMH (PCOS: 19.6pmol/l, 95%CI 7.5 to 55.3 versus controls: 6.6 pmol/l, 95%CI 2.6 to 15.9; $P < 0.001$). The AMH prohormone index (API = [proAMH]/[total AMH] x 100) was then used as a surrogate marker of conversion of proAMH to AMH_{N,C}, i.e. low index indicating increased proAMH conversion into receptor-competent isoform. No difference in the API was found between patients with and without PCOS when we stratified the population study group based only on PCOS diagnosis (PCOS: 34.6%, 95%CI 28.6 to 48.3 versus controls: 38.2%, 95%CI 28.7 to 51.0; $P = 0.8$).

When patients were grouped by BMI, obese women compared with their normal weight counterparts in both control and PCOS groups had an API significantly lower (respectively for controls with normal weight: 39.02%, 95%CI 32.2 to 54.5 versus obese: 34.6%, 95%CI 28.12 to 42.48; $p = 0.015$; and for women with PCOS with normal weight: 42.4%, 95%CI 31.5 to 48.6 versus obese: 35.22%, 95%CI 27.63 to 49.42; $p < 0.001$), suggesting a greater conversion of proAMH to AMH_{N,C} (**Figure 1; Supplementary Table 4**). Serum total AMH and proAMH levels were not significantly different between obese and normal weight women in each group (**Figure 1; Supplementary Table 4**), respectively, in control group for serum total AMH levels ($p=1.0$) and for serum proAMH level ($p=1.0$) and in the women with PCOS group for serum total AMH ($p = 1.0$) and for serum proAMH level ($p = 0.468$).

| | Control (C) N= 37 | | | | PCOS (P) N= 70 | | | |
|------------------------|---|----------------------------|---|----------------------------|---|----------------------------|---|----------------------------|
| | Normal weight (NC) Med (5 th -95 th) N= 21 | p | Obese (OC) Med (5 th -90 th) N= 16 | p | Normal weight (NP) Med (5 th -95 th) N= 28 | p | Obese (OP) Med (5 th -95 th) N= 42 | p |
| EFP total AMH (pmol/L) | 17 (6.56 – 36.06) | c (p<0.001) d (p<0.001) | 17.9 (8.6 – 29.72) | c (p<0.001) d (p<0.001) | 48.4 (26.7 - 128.3) | a (p<0.001) b (p<0.001) | 47.3 (23.51 - 153.3) | a (p<0.001) b (p<0.001) |
| EFP pro AMH (pmol/L) | 6.6 (2.42 - 18.0) | c (p<0.001) d (p<0.001) | 6.2 (2.6 – 12.66) | c (p<0.001) d (p<0.001) | 22.2 (10.8 - 56.7) | a (p<0.001) b (p<0.001) | 17.6 (6.9 - 52.5) | a (p<0.001) b (p<0.001) |
| EFP API (%) | 39.02 (32.2 - 54.5) | b (p=0.015) d (p=0.004) | 34.6 (28.12 – 42.48) | a (p=0.015) c (p=0.004) | 42.4 (31.5 - 48.6) | b (p=0.004) d (p<0.001) | 35.22 (27.63 - 49.42) a,c | a (p=0.004) c (p<0.001) |

Supplementary Table 5: AMH molecular forms in the early follicular phase (EFP) serum: women with polycystic ovary syndrome (PCOS) versus controls split by body mass index (BMI). a: statistically different from normal weight control (NC); b: statistically different from obese control (OC); c: statistically different from normal weight women with PCOS (NP); d: statistically different from obese women with PCOS (OP).

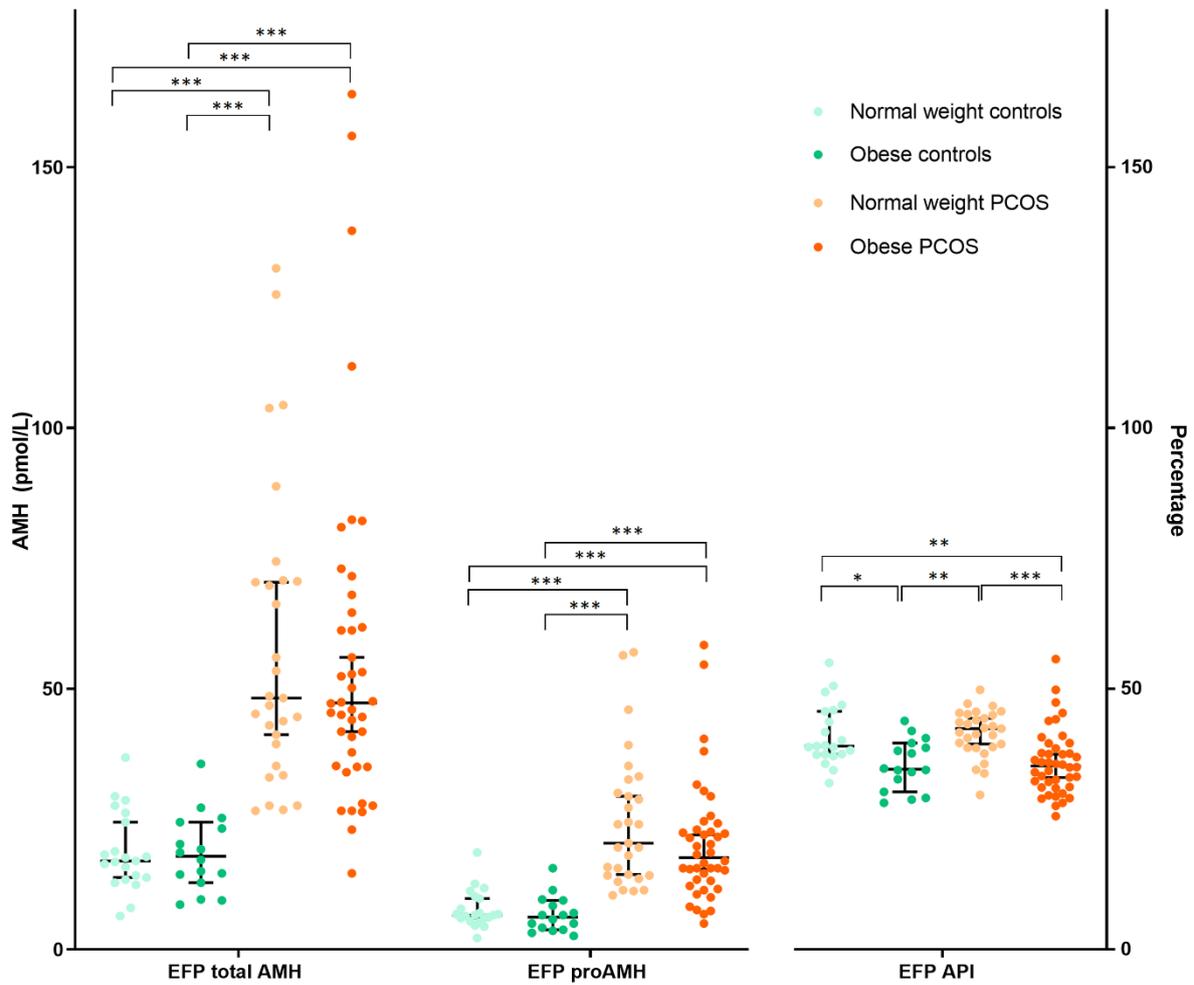


Figure 1: AMH molecular forms in the early follicular phase (EFP) serum: women with polycystic ovary syndrome (PCOS) versus controls split by body mass index (BMI).

Total AMH (pmol/L), AMH proprotein (proAMH) (pmol/L) and API = $(\text{proAMH}/\text{totalAMH}) \times 100$ in women with PCOS and controls, according to their BMI (obese = $\text{BMI} \geq 30.0 \text{ kg/m}^2$) and normal weight ($\text{BMI} \leq 25.0 \text{ kg/m}^2$). Green dots : control women ($N = 37$) with lighter green dots, normal weight control women ($N = 21$) and darker green dots, obese control women ($N = 16$); Orange dots : women with PCOS ($N = 70$) with lighter orange dots, normal weight women with PCOS ($N = 28$) and darker orange dots, obese women with PCOS ($N = 42$). Data are presented as medians with interquartile ranges. * $p = 0.015$, ** $p = 0.004$, *** $p < 0.001$ Groups that are not linked by a line did not exhibit statistically significant differences.

Possible interactions between the API and pathophysiological features of PCOS were then investigated. When patients with PCOS and controls were grouped, a significantly lower API was found in obese compared with normal weight women (34.9 %, 95%CI 28.1 to 47.5 versus 41.2%, 95%CI 32.8 to 50.2, respectively; $p < 0.001$), whereas total AMH and proAMH levels were not significantly different $p = 0.393$ and $p = 0.945$, respectively).

In the whole population ($n = 107$), the API negatively correlated to some metabolic parameters: weight ($r = -0.578$; $p < 0.01$), BMI ($r = -0.557$; $p < 0.01$), waist circumference ($r = -0.530$; $p < 0.01$), triglycerides level ($r = -0.191$; $p < 0.05$) and fasting insulinemia ($r = -0.351$; $p < 0.01$) (**Figure 2, Table 2**). Moreover, the API was found to be positively correlated with SHBG ($r = 0.293$; $p < 0.01$), and HDL cholesterol level ($r = 0.221$; $p < 0.05$) (**Figure 2, Table 2**). No significant correlation was found with serum androgens, LH, LDL cholesterol or total cholesterol levels (**Table 2**).

| | Serum EFP API <i>rho Spearman</i> | FF API <i>rho Spearman</i> |
|--|--------------------------------------|-------------------------------|
| Age | -0.16 | .088 |
| Weight | -.578** | -.192 |
| BMI | -.557** | -.094 |
| Waist Circumference | -.530** | -.262 |
| Testosterone | -0.168 | -.052 |
| Androstendione | -0.073 | -.080 |
| Estradiol | -0.025 | .092 |
| LH | 0.042 | -.128 |
| FSH | 0.134 | .278 |
| SHBG | .293** | .650 |
| Fasting Glycaemia | -0.121 | -.285 |
| Fasting Insulinemia | -.351** | -.550 |
| Total cholesterol | -0.056 | |
| HDL Cholesterol | .221* | |
| LDL cholesterol | -0.092 | |
| Triglycerides | -.191* | |
| Total AFC both ovaries | 0.003 | -.062 |
| Serum total AMH at the end of stimulation (ES) | | -.197 |
| Serum proAMH at ES | | -.136 |
| Serum API at ES | | .283 |

Table 2: Correlation of proAMH ratio in the serum and follicular fluid with clinical, hormonal, ultrasonographic, and metabolic parameters.

EFP: early follicular phase, FF: follicular fluid; *significant at the level 0.05 (bilateral), ** significant at the level 0.01 (bilateral)

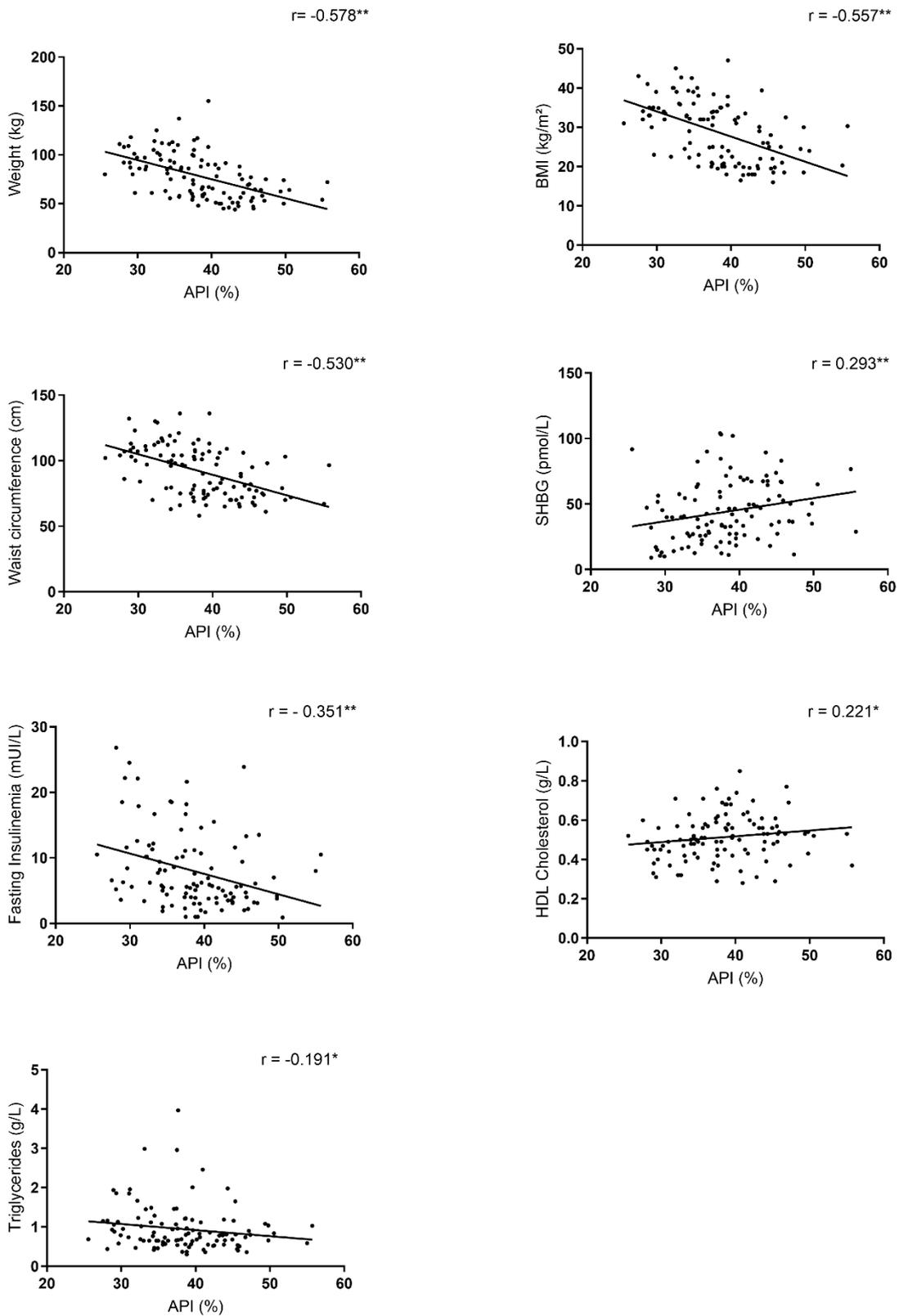


Figure 2: Correlation of AMH prohormone index (API) in the early follicular phase serum with metabolic parameters.

Spearman correlation; EFP: early follicular phase, API: (proAMH/totalAMH) \times 100. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, r = correlation coefficient.

Molecular forms of anti-Müllerian hormone in follicular fluid and serum of patients at the end of ovarian stimulation

ProAMH is known to be secreted by granulosa cells and thus released into the follicular fluid before reaching the serum (Campbell *et al.*, 2012). An attempt was made to determine whether the cleavage of this protein occurs within the ovaries or in the serum by analysing the API in those samples.

Because the API in early follicular phase serum was only different between obese and normal weight women, this second part of the study focused on 39 patients: 20 normal weight women (including 10 with PCOS) and 19 obese women (including nine with PCOS). The proportion of patients with PCOS in both groups (obese and normal weight) was not different ($p = 1.0$). The main clinical, hormonal, metabolic, ultrasound and ovarian stimulation features of this second study population are shown in **Supplementary Table 6**.

| | Normal weight N= 20 Med (I090) or N (%) | Obese N= 19 Med (I090) or N (%) | p |
|---|--|--|--------|
| Age (y) | 33.5 (27.2- 39) | 32 (25-40) | 0.444 |
| Weight (kg) | 59 (50.2- 73.9) | 83 (70- 96) | <0.001 |
| BMI (kg/m ²) | 22.0 (18.3- 24.8) | 32.4 (29- 34.5) | <0.001 |
| Waist circumference (cm) N=3 / N=5 | 69 | 103 | 0.036 |
| Current Smoking | 1 (5) | 2 (10.5) | 0.605 |
| PCOS status | 10 (50) | 9 (47.4) | 1 |
| Regular cycles | 13 (65) | 12 (63.2) | 1 |
| Hyperandrogenism | 5 (25) | 7 (36.8) | 0.650 |
| Testosterone D2 (ng/ml) | 0.31 (0.190-0.43) | 0.36 (0.17-0.60) | 0.221 |
| Androstendione D2 (ng/ml) | 1.01 (0.67-1.63) | 1.02 (0.47-2.01) | 0.270 |
| FSH D2 (IU/L) | 6.0 (4.04-7.9) | 5.0 (3.5-7.0) | 0.099 |
| LH D2 (IU/L) | 4.7 (2.1-8.7) | 4.2 (1.8-13.2) | 0.849 |
| Estradiol D2 (pg/ml) | 31 (22.1-59.2) | 35 (14-54.8) | 0.740 |
| AMH before ovarian stimulation (pmol/L) | 36.7 (14.1-92.1) | 28.3 (11.5-93) | 0.627 |
| Fasting glucose (g/L) N=4 /N=5 | 0.8 | 0.84 | 0.413 |
| Insulinemia (mIU/ml) N=4 /N=5 | 2.4 | 7.6 | 0.063 |
| SHBG (pmol/L) N=4/N=5 | 49.65 | 38.5 | 0.190 |
| total AFC both ovaries (n) | 28 (17.2-58.2) | 34.5 (17.7-61.2) | 1 |
| Days of stimulation (n) | 11 (9-12.9) | 11 (10-16) | 0.569 |
| E2 on triggering day (pg/ml) N= 14 / N=12 | 2724 (758.5-4504) | 2570 (1395-4111) | 0.940 |
| Total dose FSH (IU) | 1650 (934.2-3986.2) | 2200 (1475-3600) | 0.204 |
| Number of oocytes retrieved | 9 (3.1-18.8) | 10 (5-18.2) | 0.424 |

Supplementary Table 6: Population characteristics at the end of ovarian stimulation study.

D2 = menstrual cycle day 2; N = number of data if some are missing

Total AMH and proAMH were measured in the follicular fluid retrieved after oocyte retrieval as well as in the concomitant sampled serum of each woman. The total AMH and the proAMH were comparable in normal weight versus obese women when comparing the protein amount either in the follicular fluid or in the serum (**Supplementary Table 7**); respectively in the follicular fluid for total AMH (18.9 pmol/l, 95%CI 7.2 to 56.4 versus 21.4 pmol/l, 95%CI 6.6 to 86; $p = 0.627$) and for proAMH (13.1 pmol/l, 95%CI 4.9 to 43.4 versus 15.4 pmol/l, 95%CI 3.6 to 76; $p = 0.879$). When the API was analysed, no significant differences were found in the follicular fluid between the two study groups ($p = 0.478$) (**Figure 3 A; Supplementary Table 7**), whereas the API was significantly reduced in the concomitant serum of obese women compared with normal weight women ($p = 0.001$) (**Figure 3 B; Supplementary Table 7**). Interestingly, in both normal weight and obese women, the API was significantly higher ($p < 0.001$) in the follicular fluid than in matched serum samples (**Figure 3 A and B; Supplementary Table 7**), thus suggesting that most of the cleavage of proAMH occurs in the general circulation rather than in the ovaries.

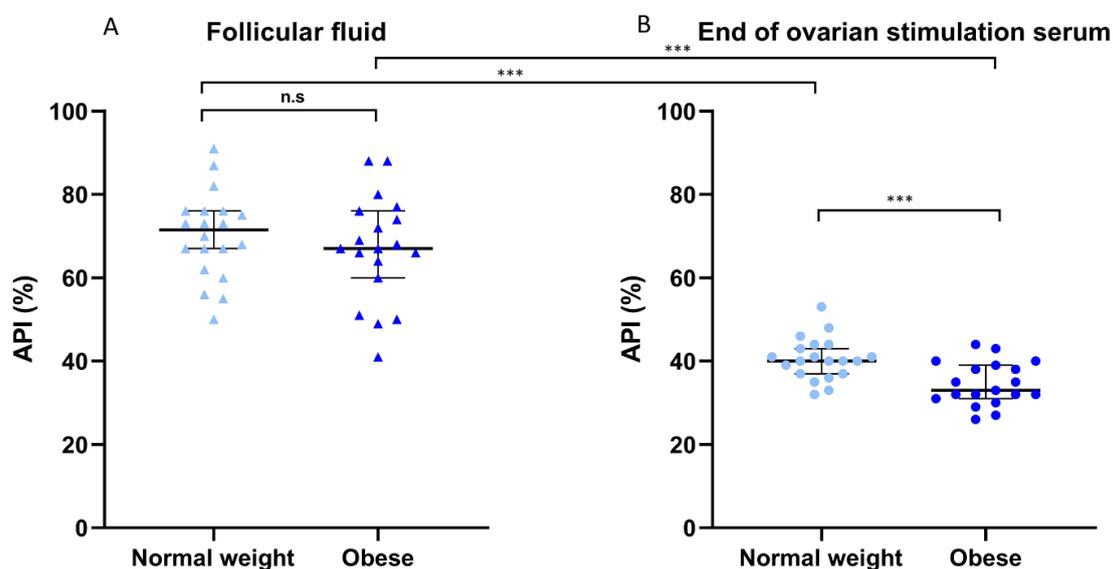


Figure 3: Proportion of AMH molecular forms in the follicular fluid and in the end of ovarian stimulation serum: normal weight versus obese women. API (API: AMH prohormone index ($\text{proAMH}/\text{totalAMH}$) \times 100) values in follicular fluid (FF) (A) and serum at the end of ovarian stimulation for IVF (B) of the same obese or normal weight women. Light blue, normal weight women ($N = 20$); dark blue, obese women ($N = 19$); triangles, follicular fluid (A); circles, end of ovarian stimulation serum (B). Data are presented as medians with interquartile ranges. *** $p \leq 0.001$.

| | Normal weight Med (10e-90e) N= 20 | Obese Med (10e-90e) N= 19 | p |
|-----------------------------|---|---------------------------------|--------------|
| FF total AMH (pmol/L) | 18.9 (7.2 – 56.4) | 21.4 (6.6 – 86) | 0.627 |
| FF pro AMH (pmol/L) | 13.1 (4.9 – 43.4) | 15.4 (3.6 – 76) | 0.879 |
| FF API (%) | 71.1 (55.0 -86.8) | 67.4 (48.6 – 88.2) | 0.478 |
| ES Serum total AMH (pmol/L) | 12.9 (4.4 -44.7) | 10.4 (3.0-70.2) | 0.444 |
| ES Serum pro AMH (pmol/L) | 5.2 (1.8 – 18.2) | 3.6 (1.2-22.2) | 0.224 |
| ES Serum API (%) | 40.4 (33.0-48.1) | 32.8 (26.9-43.2) | 0.001 |

Supplementary Table 7: Proportion of AMH molecular forms in the follicular fluid (FF) and in the end of ovarian stimulation serum (ES Serum): normal weight versus obese women.

Lastly, no correlation was found between the API in follicular fluid and any clinical, hormonal, metabolic, ultrasonographic or ovarian stimulation parameters studied (**Table 2**) (univariate analysis in the whole population, [n= 39]).

Discussion

In this study, we found that the proportion of the inactive form of AMH in the serum is higher in normal weight compared with obese women (greater API value), independently of PCOS. Consistently with this, obese women have a lower API than women with normal weight, pointing to a more pronounced AMH cleavage in obesity. In contrast with our findings, Pankhurst *et al.* (Pankhurst *et al.*, 2017) described a minor reduction in the ratio between proAMH (inactive) over total AMH in PCOS women. This study involved a heterogeneous study group in which all patients were overweight, but the PCOS group had a higher incidence of obesity. Our data is in keeping with the view that women with PCOS have a heterogenous spectrum of phenotypic presentation highly susceptible to several variables, such as age, BMI, diet composition, to name a few, and that future areas of research should take the different clinical features of PCOS into account.

Our data confirm and expand upon a recent study showing that the ratio of AMH isoforms do not differ between patients with PCOS and controls (Wissing *et al.*, 2019), thus implying a similar distribution of uncleaved (inactive) and cleaved AMH in the two study groups. Wissing *et al.* analysed a study group composed of women who were either normal weight, slightly

overweight, had PCOS and were taking metformin or all three. They reported a negative correlation between metabolic parameters and the proportion of inactive AMH form in the serum. Here, we confirmed the correlation results found in Wissing et al., with an even greater coefficient of correlation between the API and BMI ($r = -0.557$) and waist circumference ($r = -0.530$) and demonstrated that a greater processing of AMH in the circulation does not associate with PCOS but rather with a severe metabolic disturbance such as obesity.

In this study, we found significantly less conversion of proAMH into the cleaved isoform (AMH_{N,C}) in the follicular fluid when compared with the concomitant serum of the study subjects, which was independent of their weight and disease state (PCOS or not). In contrast to a previous study (Pierre *et al.*, 2016), which described a higher cleavage of AMH in the follicular fluid in women with PCOS compared to controls, we did not find a difference of cleavage of AMH at the follicular fluid level between women with PCOS and controls. Part of this discrepancy could be explained by the smaller number of patients recruited in the study by Pierre et al. as compared with the present work and by the different analytical methods used to measure AMH isoforms in the two studies.

Our data suggest that the cleavage of proAMH only partly occurs at the follicular level and that most of the cleavage of proAMH mainly occurs in extra-ovarian tissues. Subtilisin/kexin-like proprotein convertases such as furin (PCSK3) or PCSK5 are thought to be responsible for AMH cleavage (Nachtigal and Ingraham, 1996). Plasmin is also a candidate for proAMH cleavage because, *in vitro*, recombinant proAMH can be cleaved by plasmin (Pepinsky *et al.*, 1988). Some investigators have described that proAMH cleaving proteases are found in vascular tissues (reviewed in (McLennan and Pankhurst, 2015)). The *in-vivo* cleavage of proAMH remains largely unknown and it likely occurs at several levels and tissues. Interestingly, serum furin levels are known to be modulated by inflammatory conditions, such as those found in metabolic or cardio-vascular diseases (Fathy *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2017). Further studies are required to assess the *in-vivo* molecular nature of the AMH cleavage, the exact anatomical sites of AMH conversion and whether this could be influenced by the metabolic status of the individual.

An emerging hypothesis proposes that AMH may play several key extra-gonadal roles, acting across multiple sites along the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (Barbotin *et al.*, 2019). This raises the hypothesis that AMH could act as an endocrine signal, virtually operating on any cell type expressing its exclusive binding receptor AMHR2 throughout the body. Indeed, AMH and AMHR2 expression have been reported in prostate, lungs (Gustafson *et al.*, 1993)

and several other organs, including the brain (Wang *et al.*, 2005, 2009; Lebeurrier *et al.*, 2008; Cimino *et al.*, 2016; Malone *et al.*, 2019) and the pituitary (Garrel *et al.*, 2016). Moreover, metabolic organs such as liver and pancreas as well as the hypothalamic arcuate nucleus also express AMHR2 (Cimino *et al.*, 2016; Segerstolpe *et al.*, 2016; “The human protein atlas,” n.d.), suggesting that potentially AMH could act on those tissues.

The present finding should be interpreted with caution regarding the study sample size as no formal size calculation was conducted to determine the appropriate number of patients and control. In a posterior power calculation, we calculated that, with our study sample size (37 controls and 70 women with PCOS), we could detect with a 80% power (two-tailed test at 5% significance level), an effect size of 0.57 (expressed as standardized mean difference and interpreted as medium effect size (Cohen, 1992)).

In conclusion, this study shows that circulating AMH isoform concentrations cannot be used to improve the precision of PCOS phenotype diagnosis. The novelty of this study, however, relies on the findings that a higher proportion of cleaved, most likely bioactive, AMH (AMH_{N,C}) is detectable in the serum of obese women compared with women of normal weight; and a greater cleavage of proAMH to AMH_{N,C} is likely occurring in extra-ovarian tissues and exacerbated in obese women. This study opens new avenues of investigation aimed at addressing novel roles of AMH in the context of metabolic disturbances associated with reproductive alterations.

Acknowledgments

We would like to thank Dr Isabelle Loison, Dr Anne-Laure Barbotin, Dr Virgine Simon, Lydie Lombardo and Sylvie Vanoverschele for their precious help in collecting samples.

References

- Abbara A, Eng PC, Phylactou M, Clarke SA, Hunjan T, Roberts R, Vimalasvaran S, Christopoulos G, Islam R, Purugganan K, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH) in the Diagnosis of Menstrual Disturbance Due to Polycystic Ovarian Syndrome. *Front Endocrinol* [Internet] 2019;10:.
- Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update* 2005;11:357–374.
- Al-Asaad I, Chardard D, Clemente N di, Picard J-Y, Dumond H, Chesnel A, Flament S. Müllerian inhibiting substance in the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*. *Endocrinology* 2013;154:3931–3936.
- Andersen CY, Byskov AG. Estradiol and regulation of anti-Müllerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4064–4069.
- Arce J-C, La Marca A, Mirner Klein B, Nyboe Andersen A, Fleming R. Antimüllerian hormone in gonadotropin releasing-hormone antagonist cycles: prediction of ovarian response and cumulative treatment outcome in good-prognosis patients. *Fertil Steril* 2013;99:1644–1653.
- Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, Leeuwen EC van, Themmen AP, Grootegoed JA. Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 1995;136:4951–4962.
- Barbie TU, Barbie DA, MacLaughlin DT, Maheswaran S, Donahoe PK. Mullerian Inhibiting Substance inhibits cervical cancer cell growth via a pathway involving p130 and p107. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15601–15606.
- Barbotin A-L, Peigné M, Malone SA, Giacobini P. Emerging Roles of Anti-Müllerian Hormone in Hypothalamic-Pituitary Function. *Neuroendocrinology* 2019;109:218–229.
- Bédécarrats GY, O'Neill FH, Norwitz ER, Kaiser UB, Teixeira J. Regulation of gonadotropin gene expression by Mullerian inhibiting substance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9348–9353.
- Bézard J, Vigier B, Tran D, Mauléon P, Josso N. Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. *J Reprod Fertil* 1987;80:509–516.
- Brodin T, Hadziosmanovic N, Berglund L, Olovsson M, Holte J. Antimüllerian hormone levels are strongly associated with live-birth rates after assisted reproduction. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:1107–1114.
- Broer SL, Disseldorp J van, Broeze KA, Dolleman M, Opmeer BC, Bossuyt P, Eijkemans MJC, Mol B-WJ, Broekmans FJM, Group on behalf of the I study, 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. *Hum Reprod Update* 2013a;19:26–36. Oxford Academic.
- Broer SL, Dólleman M, Disseldorp J van, Broeze KA, Opmeer BC, Bossuyt PMM, Eijkemans MJC, Mol BW, Broekmans FJM, IPD-EXPORT Study Group. Prediction of an excessive response in in vitro fertilization from

patient characteristics and ovarian reserve tests and comparison in subgroups: an individual patient data meta-analysis. *Fertil Steril* 2013b;100:420-429.e7.

Campbell BK, Clinton M, Webb R. The Role of Anti-Müllerian Hormone (AMH) During Follicle Development in a Monovulatory Species (Sheep). *Endocrinology* 2012;153:4533–4543.

Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen APN, Hovatta O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod Oxf Engl* 2006;21:2223–2227.

Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 1986;45:685–698.

Catteau-Jonard S, Bancquart J, Poncelet E, Lefebvre-Maunoury C, Robin G, Dewailly D. Polycystic ovaries at ultrasound: normal variant or silent polycystic ovary syndrome? *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012;40:223–229.

Catteau-Jonard S, Jamin SP, Leclerc A, Gonzalès J, Dewailly D, Clemente N di. Anti-Müllerian hormone, its receptor, FSH receptor, and androgen receptor genes are overexpressed by granulosa cells from stimulated follicles in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4456–4461.

Chang H-M, Klausen C, Leung PCK. Antimüllerian hormone inhibits follicle-stimulating hormone-induced adenylyl cyclase activation, aromatase expression, and estradiol production in human granulosa-lutein cells. *Fertil Steril* 2013;100:585-592.e1.

Chauvin M, Garambois V, Colombo P-E, Chentouf M, Gros L, Brouillet J-P, Robert B, Jarlier M, Dumas K, Martineau P, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH) autocrine signaling promotes survival and proliferation of ovarian cancer cells. *Sci Rep* 2021;11:2231.

Cheon KY, Chung YJ, Cho HH, Kim MR, Cha JH, Kang CS, Lee JY, Kim JH. Expression of Müllerian-Inhibiting Substance/Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor in the Human Theca Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:3376–3385.

Christian CA, Moenter SM. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev* 2010;31:544–577.

Cimino I, Casoni F, Liu X, Messina A, Parkash J, Jamin SP, Catteau-Jonard S, Collier F, Baroncini M, Dewailly D, et al. Novel role for anti-Müllerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. *Nat Commun* 2016;7:10055.

Clemente N di, Jamin SP, Lugovskoy A, Carmillo P, Ehrenfels C, Picard J-Y, Whitty A, Josso N, Pepinsky RB, Cate RL. Processing of anti-müllerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-beta. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2010;24:2193–2206.

Clemente N di, Racine C, Pierre A, Taieb J. Anti-Müllerian hormone in female reproduction. *Endocr Rev* 2021;bnab012.

Clemente N di, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, Picard JY, Vigier B, Josso N, Cate R. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. *Mol Endocrinol Baltim Md* 1994;8:1006–1020.

Cohen J. A power primer. *Psychol Bull* 1992;112:155–159.

Cook CL, Siow Y, Brenner AG, Fallat ME. Relationship between serum müllerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril* 2002;77:141–146.

Crosignani PG, Nicolosi AE. Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity. *Hum Reprod Update* 2001;7:3–7.

Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 1999;60:216–222.

Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, Griesinger G, Kelsey TW, La Marca A, Lambalk C, et al. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum Reprod Update* 2014;20:370–385.

Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, Duhamel A, Catteau-Jonard S. Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod Oxf Engl* 2011;26:3123–3129.

Dumesic DA, Lesnick TG, Stassart JP, Ball GD, Wong A, Abbott DH. Intrafollicular antimüllerian hormone levels predict follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone (FSH) in normoandrogenic ovulatory women undergoing gonadotropin releasing-hormone analog/recombinant human FSH therapy for in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 2009;92:217–221.

Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, Marshall JC, Laven JS, Legro RS. Scientific Statement on the Diagnostic Criteria, Epidemiology, Pathophysiology, and Molecular Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev* 2015;36:487–525.

Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, Jong FH de, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001;142:4891–4899.

Durlinger AL, Kramer P, Karels B, Jong FH de, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999;140:5789–5796.

Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JTT, Grootegoed JA, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002;143:1076–1084.

Escobar-Morreale HF. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2018;14:270–284.

Fathy SA, Hamid FFA, Zabut BM, Jamee AF, Ali MAM, Mustafa AMA. Diagnostic utility of BNP, corin and furin as biomarkers for cardiovascular complications in type 2 diabetes mellitus patients. *Biomarkers* 2015;20:460–469.

Foecking EM, Szabo M, Schwartz NB, Levine JE. Neuroendocrine consequences of prenatal androgen exposure in the female rat: absence of luteinizing hormone surges, suppression of progesterone receptor gene expression, and acceleration of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator. *Biol Reprod* 2005;72:1475–1483.

Garrel G, Denoyelle C, L'Hôte D, Picard J-Y, Teixeira J, Kaiser UB, Laverrière J-N, Cohen-Tannoudji J. GnRH Transactivates Human AMH Receptor Gene via Egr1 and FOXO1 in Gonadotrope Cells. *Neuroendocrinology* 2019;108:65–83.

Garrel G, Racine C, L'Hôte D, Denoyelle C, Guigon CJ, Clemente N di, Cohen-Tannoudji J. Anti-Müllerian hormone: a new actor of sexual dimorphism in pituitary gonadotrope activity before puberty. *Sci Rep* 2016;6:srep23790.

Griesinger G, Dafopoulos K, Buendgen N, Cascorbi I, Georgoulas P, Zavos A, Messini CI, Messinis IE. Elimination half-life of anti-Müllerian hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2160–2163.

Grøndahl ML, Nielsen ME, Dal Canto MB, Fadini R, Rasmussen IA, Westergaard LG, Kristensen SG, Yding Andersen C. Anti-Müllerian hormone remains highly expressed in human cumulus cells during the final stages of folliculogenesis. *Reprod Biomed Online* 2011;22:389–398.

Grossman MP, Nakajima ST, Fallat ME, Siow Y. Müllerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. *Fertil Steril* 2008;89:1364–1370.

Gustafson ML, Lee MM, Asmundson L, MacLaughlin DT, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance in the diagnosis and management of intersex and gonadal abnormalities. *J Pediatr Surg* 1993;28:439–444.

Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N, Craig LB. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertil Steril* 2011;95:170–175.

Haqq C, Lee MM, Tizard R, Wysk M, DeMarinis J, Donahoe PK, Cate RL. Isolation of the rat gene for Mullerian inhibiting substance. *Genomics* 1992;12:665–669.

Hayes E, Kushnir V, Ma X, Biswas A, Prizant H, Gleicher N, Sen A. Intra-cellular mechanism of Anti-Müllerian hormone (AMH) in regulation of follicular development. *Mol Cell Endocrinol* 2016;433:56–65.

Helden J van, Weiskirchen R. Performance of the two new fully automated anti-Müllerian hormone immunoassays compared with the clinical standard assay. *Hum Reprod Oxf Engl* 2015;30:1918–1926.

Johnson AL, Haugen MJ, Woods DC. Role for inhibitor of differentiation/deoxyribonucleic acid-binding (Id) proteins in granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 2008;149:3187–3195.

Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Revisiting the ovarian volume as a diagnostic criterion for polycystic ovaries. *Hum Reprod Oxf Engl* 2005;20:2893–2898.

Josso N, Clemente N di. Transduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. *Trends Endocrinol Metab TEM* 2003;14:91–97.

Jost A. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. III. Rôle des gonades foetales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch Anat Microsc Morph Exp* 1947;36:271–315.

Kedem-Dickman A, Maman E, Yung Y, Yerushalmi GM, Hemi R, Hanochi M, Dor J, Hourvitz A. Anti-Müllerian hormone is highly expressed and secreted from cumulus granulosa cells of stimulated preovulatory immature and atretic oocytes. *Reprod Biomed Online* 2012;24:540–546.

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

Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, Lang-Born BMN van de, Jong FH de, Groome NP, Themmen APN, Visser JA. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* 2006;147:3228–3234.

Kim JH, MacLaughlin DT, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone: A novel treatment for gynecologic tumors. *Obstet Gynecol Sci* 2014;57:343–357.

Kristensen SG, Mamsen LS, Jeppesen JV, Bøtkjær JA, Pors SE, Borgbo T, Ernst E, Macklon KT, Andersen CY. Hallmarks of Human Small Antral Follicle Development: Implications for Regulation of Ovarian Steroidogenesis and Selection of the Dominant Follicle. *Front Endocrinol* 2017;8:376.

Kuroda T, Lee MM, Ragin RC, Hirobe S, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance production and cleavage is modulated by gonadotropins and steroids. *Endocrinology* 1991;129:2985–2992.

La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Arsenio AC, Stabile G, Volpe A. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 2010;16:113–130.

Lahbib-Mansais Y, Barbosa A, Yerle M, Parma P, Milan D, Pailhoux E, Gellin J, Cotinot C. Mapping in pig of genes involved in sexual differentiation: AMH, WT1, FTZF1, SOX2, SOX9, AHC, and placental and embryonic CYP19. *Cytogenet Cell Genet* 1997;76:109–114.

Lambert-Messerlian G, Plante B, Eklund EE, Raker C, Moore RG. Levels of antimüllerian hormone in serum during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 2016;105:208-213.e1.

Lebeurrier N, Launay S, Macrez R, Maubert E, Legros H, Leclerc A, Jamin SP, Picard J-Y, Marret S, Laudénbach V, et al. Anti-Mullerian-hormone-dependent regulation of the brain serine-protease inhibitor neuroserpin. *J Cell Sci* 2008;121:3357–3365.

Lutterodt M, Byskov AG, Skouby SO, Tabor A, Yding Andersen C. Anti-Müllerian hormone in pregnant women in relation to other hormones, fetal sex and in circulation of second trimester fetuses. *Reprod Biomed Online* 2009;18:694–699.

Malone SA, Papadakis GE, Messina A, Mimouni NEH, Trova S, Imbernon M, Allet C, Cimino I, Acierno J, Cassatella D, et al. Defective AMH signaling disrupts GnRH neuron development and function and contributes to hypogonadotropic hypogonadism. *eLife* 2019;8:.

Mamsen LS, Petersen TS, Jeppesen JV, Møllgård K, Grøndahl ML, Larsen A, Ernst E, Oxvig C, Kumar A, Kalra B, et al. Proteolytic processing of anti-Müllerian hormone differs between human fetal testes and adult ovaries. *MHR Basic Sci Reprod Med* 2015;21:571–582.

McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJ. Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biol Reprod* 2001;64:293–298.

McLennan IS, Pankhurst MW. Anti-Müllerian hormone is a gonadal cytokine with two circulating forms and cryptic actions. *J Endocrinol* 2015;226:R45–R57.

Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, Cate RL, Behringer RR. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev* 1996;10:2577–2587.

Münsterberg A, Lovell-Badge R. Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Dev Camb Engl* 1991;113:613–624.

Nachtigal MW, Ingraham HA. Bioactivation of Müllerian inhibiting substance during gonadal development by a *kex2*/subtilisin-like endoprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7711–7716.

Nelson SM, Stewart F, Fleming R, Freeman DJ. Longitudinal assessment of antimüllerian hormone during pregnancy-relationship with maternal adiposity, insulin, and adiponectin. *Fertil Steril* 2010;93:1356–1358.

Nilsson EE, Schindler R, Savenkova MI, Skinner MK. Inhibitory actions of Anti-Müllerian Hormone (AMH) on ovarian primordial follicle assembly. *PLoS One* 2011;6:e20087.

Novembri R, Funghi L, Voltolini C, Belmonte G, Vannuccini S, Torricelli M, Petraglia F. Placenta expresses anti-Müllerian hormone and its receptor: Sex-related difference in fetal membranes. *Placenta* 2015;36:731–737.

Oreal E, Pieau C, Mattei MG, Josso N, Picard JY, Carré-Eusèbe D, Magre S. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 1998;212:522–532.

Pankhurst MW, Chong YH, McLennan IS. Enzyme-linked immunosorbent assay measurements of antimüllerian hormone (AMH) in human blood are a composite of the uncleaved and bioactive cleaved forms of AMH. *Fertil Steril* 2014;101:846–850.

Pankhurst MW, Chong YH, McLennan IS. Relative levels of the proprotein and cleavage-activated form of circulating human anti-Müllerian hormone are sexually dimorphic and variable during the life cycle. *Physiol Rep* 2016a;4:e12783.

Pankhurst MW, Clark CA, Zarek J, Laskin CA, McLennan IS. Changes in Circulating ProAMH and Total AMH during Healthy Pregnancy and Post-Partum: A Longitudinal Study. *PLoS One* 2016b;11:e0162509.

Pankhurst MW, McLennan IS. Human blood contains both the uncleaved precursor of anti-Müllerian hormone and a complex of the NH₂- and COOH-terminal peptides. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E1241–1247.

Pankhurst MW, McLennan IS. A specific immunoassay for proAMH, the uncleaved proprotein precursor of anti-Müllerian hormone. *Mol Cell Endocrinol* 2016;419:165–171.

- Pankhurst MW, Shorakae S, Rodgers RJ, Teede HJ, Moran LJ. Efficacy of predictive models for polycystic ovary syndrome using serum levels of two antimüllerian hormone isoforms (proAMH and AMHN,C). *Fertil Steril* 2017;108:851-857.e2.
- Pask AJ, Whitworth DJ, Mao C-A, Wei K-J, Sankovic N, Graves JAM, Shaw G, Renfree MB, Behringer RR. Marsupial anti-Müllerian hormone gene structure, regulatory elements, and expression. *Biol Reprod* 2004;70:160–167.
- Peigné M, Catteau-Jonard S, Robin G, Dumont A, Pigny P, Dewailly D. The numbers of 2- 5 and 6-9 mm ovarian follicles are inversely correlated in both normal women and in polycystic ovary syndrome patients: what is the missing link? *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;33:706–714.
- Pellatt L, Hanna L, Brincat M, Galea R, Brain H, Whitehead S, Mason H. Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:240–245.
- Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, Brown K, Simpson ER, Mason HD. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril* 2011;96:1246-1251.e1.
- Pepinsky RB, Sinclair LK, Chow EP, Mattaliano RJ, Manganaro TF, Donahoe PK, Cate RL. Proteolytic processing of mullerian inhibiting substance produces a transforming growth factor-beta-like fragment. *J Biol Chem* 1988;263:18961–18964.
- Peuranpää P, Hautamäki H, Halttunen-Nieminen M, Hydén-Granskog C, Tiitinen A. Low anti-Müllerian hormone level is not a risk factor for early pregnancy loss in IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod* 2020;35:504–515. Oxford Academic.
- Picard JY, Benarous R, Guerrier D, Josso N, Kahn A. Cloning and expression of cDNA for anti-müllerian hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:5464–5468.
- Picard JY, Josso N. Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol Cell Endocrinol* 1984;34:23–29.
- Picard J-Y, Josso N. Persistent Müllerian duct syndrome: an update. *Reprod Fertil Dev* 2019;31:1240–1245.
- Pierre A, Racine C, Rey RA, Fanchin R, Taieb J, Cohen-Tannoudji J, Carmillo P, Pepinsky RB, Cate RL, Clemente N di. Most Cleaved Anti-Müllerian Hormone Binds Its Receptor in Human Follicular Fluid but Little Is Competent in Serum. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:4618–4627.
- Pigny P, Gorisse E, Ghulam A, Robin G, Catteau-Jonard S, Duhamel A, Dewailly D. Comparative assessment of five serum antimüllerian hormone assays for the diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2016;105:1063-1069.e3.
- Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. Elevated Serum Level of Anti-Müllerian Hormone in Patients with Polycystic Ovary Syndrome: Relationship to the Ovarian Follicle Excess and to the Follicular Arrest. *J Clin Endocrinol Metab* 2003a;88:5957–5962.

Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. Elevated serum level of anti-müllerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab* 2003b;88:5957–5962.

Racine C, Genêt C, Bourgneuf C, Dupont C, Plisson-Petit F, Sarry J, Hennequet-Antier C, Vigouroux C, Mathieu d'Argent E, Pierre A, et al. New Anti-Müllerian Hormone Target Genes Involved in Granulosa Cell Survival in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2021;106:e1271–e1289.

Ren K, Jiang T, Zheng X-L, Zhao G-J. Proprotein convertase furin/PCSK3 and atherosclerosis: New insights and potential therapeutic targets. *Atherosclerosis* 2017;262:163–170.

Renaud EJ, MacLaughlin DT, Oliva E, Rueda BR, Donahoe PK. Endometrial cancer is a receptor-mediated target for Müllerian Inhibiting Substance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:111–116.

Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod Oxf Engl* 2004;19:41–47.

Saatcioglu HD, Kano M, Horn H, Zhang L, Samore W, Nagykerly N, Meinsohn M-C, Hyun M, Suliman R, Poulou J, et al. Single-cell sequencing of neonatal uterus reveals an *Misr2*⁺ endometrial progenitor indispensable for fertility. *eLife* 2019;8:e46349.

Sacchi S, D'Ippolito G, Sena P, Marsella T, Tagliasacchi D, Maggi E, Argento C, Tirelli A, Giulini S, La Marca A. The anti-Müllerian hormone (AMH) acts as a gatekeeper of ovarian steroidogenesis inhibiting the granulosa cell response to both FSH and LH. *J Assist Reprod Genet* 2016;33:95–100.

Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, Lamarque L, Verdié P, Bourrier E, Dehouck B, et al. Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:1512–1517.

Schmidt KLT, Kryger-Baggesen N, Byskov AG, Andersen CY. Anti-Müllerian hormone initiates growth of human primordial follicles in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 2005;234:87–93.

Schulz RW, Bogerd J, Male R, Ball J, Fenske M, Olsen LC, Tyler CR. Estrogen-induced alterations in *amh* and *dmrt1* expression signal for disruption in male sexual development in the zebrafish. *Environ Sci Technol* 2007;41:6305–6310.

Segerstolpe Å, Palasantza A, Eliasson P, Andersson E-M, Andréasson A-C, Sun X, Picelli S, Sabirsh A, Clausen M, Bjursell MK, et al. Single-Cell Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes. *Cell Metab* 2016;24:593–607.

Segev DL, Ha TU, Tran TT, Kenneally M, Harkin P, Jung M, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Maheswaran S. Müllerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFκB-mediated pathway. *J Biol Chem* 2000;275:28371–28379.

Seifer DB, Merhi Z. Is AMH a regulator of follicular atresia? *J Assist Reprod Genet* 2014;31:1403–1407.

Silva MSB, Giacobini P. New insights into anti-Müllerian hormone role in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and neuroendocrine development. *Cell Mol Life Sci* [Internet] 2020; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03576-x>.

Tata B, Mimouni NEH, Barbotin A-L, Malone SA, Loyens A, Pigny P, Dewailly D, Catteau-Jonard S, Sundström-Poromaa I, Piltonen TT, et al. Elevated prenatal anti-Müllerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood. *Nat Med* 2018;24:834–846.

Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, Piltonen T, Norman RJ, International PCOS Network. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;33:1602–1618.

The human protein atlas www.proteinatlas.org.

Tong Q, Xu Y. Central Leptin Regulation of Obesity and Fertility. *Curr Obes Rep* 2012;1:236–244.

Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 1984;114:1315–1320.

Visser JA, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2005;234:81–86.

Wang J, Dicken C, Lustbader JW, Tortoriello DV. Evidence for a Müllerian-inhibiting substance autocrine/paracrine system in adult human endometrium. *Fertil Steril* 2009;91:1195–1203.

Wang P-Y, Koishi K, McGeachie AB, Kimber M, Maclaughlin DT, Donahoe PK, McLennan IS. Mullerian inhibiting substance acts as a motor neuron survival factor in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:16421–16425.

Weenen C, Laven JSE, Von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BCJM, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10:77–83.

Western PS, Harry JL, Graves JA, Sinclair AH. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 1999;216:411–419.

Wilson CA, Clemente N di, Ehrenfels C, Pepinsky RB, Josso N, Vigier B, Cate RL. Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol Baltim Md* 1993;7:247–257.

Wissing ML, Mikkelsen AL, Kumar A, Kalra B, Pors SE, Flachs EM, Andersen CY. Associations of different molecular forms of antimüllerian hormone and biomarkers of polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril* 2019;112:149-155.e1.

Xu J, Xu F, Lawson MS, Tkachenko OY, Ting AY, Kahl CA, Park BS, Stouffer RR, Bishop CV. Anti-Müllerian hormone is a survival factor and promotes the growth of rhesus macaque preantral follicles during matrix-free culture. *Biol Reprod* 2018;98:197–207.

Fundings

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), France [grant number U1172], by the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (ERC-2016-CoG to P.G. grant agreement n° 725149/REPRODAMH), by the Centre Hospitalier Régional Universitaire, CHU de Lille, France (Bonus H to P.G.).

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

PARTIE 2 :

L'AMH ET SES FORMES MOLECULAIRES
PENDANT LA GROSSESSE, POSSIBLES
ELEMENTS PARTICIPANTS A L'HERITABILITE DU
SOPK

Introduction

Le syndrome des ovaires polykystiques est la pathologie gynéco-endocrinienne la plus fréquente et touche entre 5 et 20% de la population féminine mondiale (Teede *et al.*, 2018). Ce trouble est défini, selon les critères de Rotterdam, par au moins deux des trois caractéristiques suivantes : un trouble de l'ovulation, une hyperandrogénie et des ovaires polykystiques à l'échographie (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group, 2004; Teede *et al.*, 2018). Quatre différents phénotypes sont décrits (A, B, C et D) en fonction de l'association de ces trois symptômes entre eux. Bien que cela ne fasse pas partie des critères diagnostiques, une hypertonie de la LH est décrite chez environ 50 % des patientes porteuses d'un SOPK, surtout des patientes sans surpoids, sans que la cause en soit connue. A côté des troubles reproductifs, les femmes porteuses d'un SOPK sont aussi plus à risque de troubles métaboliques, comme l'intolérance aux hydrates de carbone ou le diabète, qui peuvent majorer leur risque cardio-vasculaire à plus long terme (Fauser *et al.*, 2012; Teede *et al.*, 2018). L'hyperinsulinisme, secondaire à cette insulino-résistance, est à l'origine d'une aggravation des symptômes du SOPK, en particulier l'hyperandrogénie et la dysovulation, et est surtout décrite chez les patientes obèses avec SOPK mais peut-être présente même chez les femmes sans surpoids (Fauser *et al.*, 2012; Escobar-Morreale, 2018).

Bien que la pathologie soit très fréquente, la physiopathologie du SOPK n'est pas bien connue. De même, les causes de son héritabilité le sont encore moins. Pourtant, il est classiquement décrit que 35 à 70% de filles de femmes avec un SOPK développeront elles-mêmes la pathologie après la puberté (Crosignani and Nicolosi, 2001; Dumesic *et al.*, 2020). Les recherches extensives d'une cause génétique ont mis en évidence des gènes, ou panel de gènes, en lien avec le SOPK mais qui ne peuvent expliquer que moins de 10 % de l'héritabilité du syndrome (Azziz, 2016; Dumesic *et al.*, 2020). Depuis plusieurs années, l'hypothèse développementale de reprogrammation environnementale *in utero*, basée sur l'hypothèse de Barker, prend de l'importance. Cette hypothèse décrit l'impact *in utero* de facteurs nutritionnels, endocriniens, métaboliques ou inflammatoires qui pourraient induire des modifications d'expressions géniques ou épigénétiques pendant le développement fœtal à l'origine d'une prédisposition au développement de pathologies ultérieures (Barker, 2007; Padmanabhan *et al.*, 2016; Kelley *et al.*, 2019). Des modèles animaux semblent valider cette hypothèse puisque les androgènes dans de nombreuses espèces animales (Abbott *et al.*, 2005; Walters *et al.*, 2018; Monniaux *et al.*, 2019; Raperport and Homburg, 2019; Stener-Victorin *et al.*, 2020), ou l'hormone anti-müllérienne (AMH), chez la souris (Tata *et al.*, 2018), provoquent

l'apparition d'un phénotype SOPK chez le fœtus féminin exposé *in utero*. Ce phénotype, en lien avec des modifications épigénétiques, se transmet même ensuite aux générations ultérieures sans nouvelle exposition exogène aux androgènes ou à l'AMH (Risal *et al.*, 2019; Mimouni *et al.*, 2021).

L'AMH est une hormone sécrétée par les cellules de la granulosa chez la femme pendant la vie fœtale dès la 21^e semaine de gestation puis jusqu'à la ménopause (Kelsey *et al.*, 2011; Vanky and Carlsen, 2012). Elle est 2 à 3 fois plus élevée dans le sérum de femmes atteintes d'un SOPK que dans celui des témoins (Cook *et al.*, 2002; Pigny *et al.*, 2003) et son taux est corrélé à la sévérité du syndrome, plus élevé chez les patientes souffrant d'une anovulation (Pellatt *et al.*, 2007; Catteau-Jonard *et al.*, 2012; Abbara *et al.*, 2019). Un rôle potentiel de l'AMH dans la physiopathologie du syndrome, en particulier dans l'arrêt de la croissance et de la maturation folliculaire, a été rapporté (Dewailly *et al.*, 2014a). L'AMH est une glycoprotéine synthétisée sous la forme d'une pro-hormone homo-dimérique de 140 kDa qui doit subir un clivage protéolytique pour devenir biologiquement active (Pepinsky *et al.*, 1988; di Clemente *et al.*, 2010). Le clivage donne naissance à deux homodimères de 110 kDa (AMH_N) et 25 kDa (AMH_C). Ces deux homodimères restent associés par une liaison non covalente (AMH_{N,C}) (Pepinsky *et al.*, 1988; Nachtigal and Ingraham, 1996) mais seule la portion C-terminale de l'hormone (AMH_C) est biologiquement active, capable de se lier au récepteur spécifique de l'AMH, l'AMHR2. Dans le SOPK, la répartition des différentes formes moléculaires de l'AMH (active et inactive) dans le sérum semble plus liée au phénotype métabolique qu'au SOPK en lui-même (Wissing *et al.*, 2019; Peigné *et al.*, 2020).

Dans le modèle de souris exposées *in utero* à l'AMH (pAMH) développé dans notre équipe, l'AMH ne peut pas passer la barrière placentaire pour agir directement sur le fœtus (Tata *et al.*, 2018). L'AMH pourrait ainsi agir en favorisant un environnement hyperandrogénique maternel, placentaire et fœtal soit (1) en modulant l'activité du neurone à GnRH, porteur de l'AMHR2 (Cimino *et al.*, 2016), et la sécrétion de LH maternelle conduisant à une hyperandrogénie ovarienne soit (2) en modifiant la stéroïdogénèse placentaire à l'origine d'une hyperandrogénie placentaire (Tata *et al.*, 2018). Cette découverte soulève la question de l'implication possible de l'AMH dans l'héritabilité du SOPK également dans l'espèce humaine.

Chez la femme, il est actuellement bien admis que l'AMH sérique diminue pendant la grossesse du fait, *a priori*, de l'hypogonadotropisme physiologique qu'elle engendre (Lutterodt *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2010; Tata *et al.*, 2018; Piltonen *et al.*, 2019). Cette baisse est maximale au troisième trimestre de la grossesse puis le taux d'AMH réaugmente de façon

progressive après l'accouchement pour retrouver son taux antérieur à la grossesse (McCredie *et al.*, 2017; Pankhurst *et al.*, 2020). Concernant les formes moléculaires de l'AMH, une seule étude dans une population témoin n'a pas montré de variation du ratio de ces différentes formes actives ou non, en fonction du terme de la grossesse (Pankhurst *et al.*, 2016b). Chez les femmes avec SOPK, des études transversales ou longitudinales partielles ont mis en évidence un taux d'AMH plus élevé au deuxième trimestre de la grossesse et au moment de l'accouchement chez les femmes avec SOPK comparées aux femmes témoins (Königer *et al.*, 2018; Tata *et al.*, 2018; Detti *et al.*, 2019; Piltonen *et al.*, 2019; Valdimarsdottir *et al.*, 2019) ; cependant, aucun suivi longitudinal dynamique complet de l'AMH tout au long de la grossesse chez des femmes avec SOPK n'a été réalisé jusqu'à ce jour.

Enfin, les études sur la stéroïdogénèse placentaire humaine sont peu nombreuses et vont dans le sens d'une modulation d'activité ou d'expression de certaines enzymes de la stéroïdogénèse, pouvant favoriser une hyperandrogénie chez les patientes avec SOPK (Maliqueo *et al.*, 2013, 2015; Novembri *et al.*, 2015).

L'objectif de notre travail était donc de suivre et de comparer l'évolution du taux plasmatique d'AMH, de ses formes moléculaires et de différentes hormones stéroïdes, en particulier les androgènes, entre une population de femmes enceintes avec SOPK et une de femmes témoins avant et tout au long de la grossesse, de façon longitudinale. Nous souhaitons également étudier les modifications d'expressions placentaires de gènes des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, en particulier l'aromatase, possiblement secondaires à cette exposition à des taux plus élevés d'AMH sérique. Notre hypothèse est que, dans le sérum, l'AMH, et en particulier sa forme clivée, active, reste plus élevée chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins et ce jusqu'au dernier trimestre de la grossesse ; elle pourrait ainsi participer à l'héritabilité du syndrome par le maintien d'un climat hyperandrogénique ayant une action *in utero* sur le fœtus. Cette action pourrait être variable en fonction des phénotypes cliniques et métaboliques des femmes avec SOPK.

Matériel et Méthodes

Il s'agit d'une étude longitudinale, monocentrique, prospective, comparative, de femmes enceintes avec SOPK et témoins.

Population

Les patientes ont été recrutées à la maternité Jeanne de Flandre (CHU de Lille) lors de la première échographie de grossesse réalisée par le médecin de la reproduction (entre 5 et 10 semaines d'aménorrhée (SA)). Il s'agit de patientes ayant eu un bilan d'infertilité (avec au minimum un dosage de l'AMH) dans le service de Gynécologie-Endocrinienne du CHU de Lille avant la grossesse et enceintes de façon spontanée, après stimulation de l'ovulation ou après assistance médicale à la procréation (AMP).

Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion pour l'étude étaient les suivants : patiente de 18 à 43 ans, ayant eu un bilan d'infertilité en pré-conceptionnel dans le service de Gynécologie-Endocrinienne du CHU de Lille (avec au minimum un dosage de l'AMH), au cours de premier trimestre d'une grossesse unique (entre 5 et 10 SA), obtenue spontanément, après induction de l'ovulation ou AMP et qui sera suivie et accouchera au CHU de Lille à la maternité Jeanne de Flandre.

Les femmes étaient ensuite réparties en deux groupes : SOPK ou témoin.

Le groupe avec SOPK était défini selon les critères de Rotterdam modifiés (2003 puis 2011) (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group, 2004; Dewailly *et al.*, 2011) par au moins 2 des 3 critères suivants :

- Trouble du cycle, défini par une oligo- spanioménorrhée ou une aménorrhée.
- Hyperandrogénie clinique ou biologique (testostéronémie totale $\geq 0,39$ ng/mL et /ou dosage de l'androsténone $\geq 1,75$ ng/mL et/ou score de Ferriman et Gallwey ≥ 6 ou acné sévère sur au moins deux zones du corps).
- Aspect morphologique d'ovaires polykystiques à l'échographie (PCOM) : Volume ovarien > 10 cm³, ou surface ovarienne $> 5,5$ cm² ou plus de 19 follicules de 2 à 9 mm par ovaire (Dewailly *et al.*, 2011).

Et ceci après exclusion de toutes les autres causes de trouble du cycle ou d'hyperandrogénie.

Dans le groupe témoin, les patientes présentaient une infertilité masculine ou tubaire stricte, pas de trouble du cycle, une réserve ovarienne normale (FSH <10 UI/L, E2 <50 pg/ml, AMH > 7 et < 35 pmol/L et un compte des follicules antraux (CFA) > 5 et < 20 par ovaire à J2-J5 du cycle). Il s'agit de femmes sans pathologie personnelle ovarienne ; le problème de fertilité étant d'une autre origine. Cette population sert d'ailleurs de témoin pour la fonction ovarienne depuis de nombreuses années et a fait ses preuves dans de nombreuses études (Pigny *et al.*, 2016).

Critères de non-inclusion

Les patientes avec une grossesse multiple, une grossesse après don d'ovocyte, une insuffisance de réserve ovarienne (AMH<7pmol/L, FSH> 12 UI/L ou CFA <5 avant la grossesse), un aspect morphologique polykystique des ovaires isolé (PCOM), une endométriose, un traitement médicamenteux au long cours (hors suppléments habituels de la grossesse), un diabète antérieur à la grossesse, un antécédent de chirurgie bariatrique, ayant une infertilité ovulatoire d'origine centrale ou idiopathique, déjà incluses dans un autre protocole, refusant de donner leur consentement, non prises en charge par la sécurité sociale, ayant une mauvaise maîtrise de la langue française, sous tutelle ou privées de liberté étaient exclues.

Objectifs de l'étude

L'objectif principal de notre étude était de comparer les taux maternels d'AMH plasmatique au troisième trimestre de la grossesse chez des femmes avec ou sans SOPK.

Nos objectifs secondaires étaient de comparer entre des femmes SOPK et des femmes témoins:

- L'évolution de l'AMH plasmatique au cours de la grossesse.
- L'évolution des différentes formes moléculaires d'AMH (pro AMH et formes actives) au cours de la grossesse.
- L'évolution de la LH, de l'œstradiol, de l'androsténone et de la testostéronémie (totale et libre) au cours de la grossesse.
- Les niveaux d'expression des gènes des enzymes de la stéroïdogénèse placentaires et de l'AMH et de son récepteur spécifique de type 2 (AMHR2).

Plan expérimental et critères d'évaluation des objectifs principaux et secondaires

Plan expérimental

Lors de 3 visites de suivi de la grossesse à Jeanne de Flandre, aux premier (T1), deuxième (T2) et troisième trimestres (T3), des tubes de sang supplémentaires sont prélevés en plus de ceux du bilan habituel de grossesse. Après l'accouchement, des biopsies placentaires sont réalisées (**Figure 1**).

Ainsi, les patientes sont recrutées et incluses dans notre étude lors de leur première échographie de grossesse entre 5 et 10 semaines d'aménorrhée. Elles bénéficient alors d'un bilan sanguin comprenant les dosages de : LH, AMH, testostéronémie totale, glycémie à jeun et œstradiol.

Les dosages de LH, d'AMH, de testostérone totale et d'œstradiol sont également réalisés aux deuxième et troisième trimestres de la grossesse. Le poids et l'indice de masse corporelle sont recueillis aux trois trimestres afin d'apprécier l'évolution du poids de la patiente au cours de la grossesse. Dans un second temps, et ce immédiatement après l'accouchement et la délivrance, le placenta est récupéré afin de réaliser des biopsies placentaires. Les informations concernant la voie d'accouchement, le sexe de l'enfant et son poids à la naissance sont alors également recueillies.

Au total, les patientes bénéficient donc de quatre bilans sanguins, le premier étant réalisé avant la grossesse (T0) et les trois autres à chaque trimestre de la grossesse (T1, T2, T3) et de prélèvements placentaires.

Secondairement des dosages d'androsténone, de SHBG et le calcul de la testostérone libre ont été demandés et seront effectués à partir de la sérothèque réalisée à chaque temps du suivi. Ils n'ont pas encore été réalisés au moment de l'écriture de ce manuscrit.

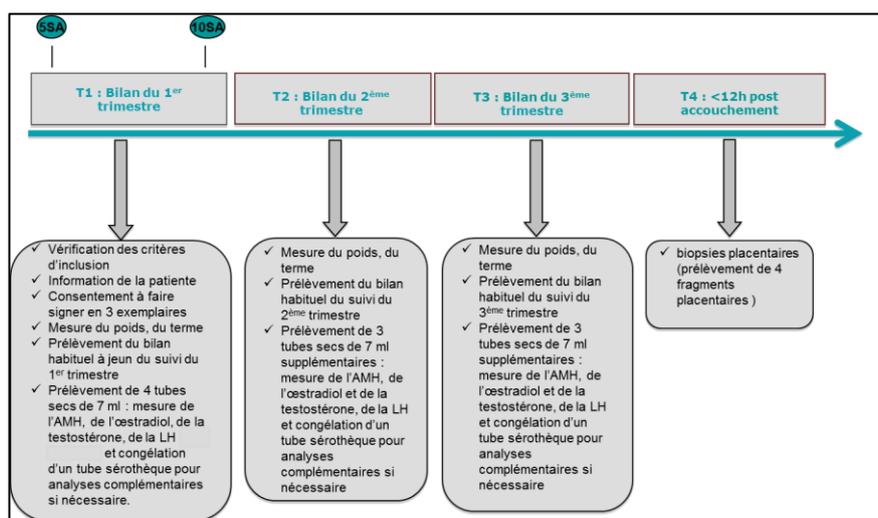


Figure 1 : Schéma du déroulement de la recherche. Descriptif des différents éléments de suivi longitudinal des patientes SOPK et témoin au cours de la grossesse.

Critères d'évaluation des objectifs principaux et secondaires

Le critère de jugement principal est le taux d'AMH sérique mesuré au 3^{ème} trimestre de la grossesse.

Les critères de jugement secondaires sont :

- La mesure, avant la grossesse (T0) puis à chaque trimestre de la grossesse (T1, T2, T3) :
 - o du taux d'AMH plasmatique
 - o du ratio des différentes formes d'AMH (pro AMH et formes clivées)
 - o des taux d'œstradiol, de LH, d'androsténone et de testostérone (totale et libre),
- Le niveau d'expression placentaire de l'aromatase (CYP19A1 : Cytochrome P450 sous famille 19 type A1), de l'AMH, de l'AMHR2 et d'autres gènes impliqués dans la stéroïdogénèse placentaire (CYP 11A1 : Cytochrome P450 sous famille 11 type A1, 3B HSD : 3 β hydroxy-stéroïde déshydrogénase, 17BHSD : 17 β hydroxy-stéroïde déshydrogénase).

Prélèvements sanguins

L'AMH a été dosée par une méthode immunométrique sur analyseur automatique Access-Dxi (Beckman Coulter, USA), la testostéronémie totale et l'oestradiolémie par une méthode compétitive sur analyseur automatique Architect (Abbott Laboratories, USA) et la LH par une méthode immunométrique par chimio-luminescence à l'aide du réactif Architect LH sur analyseur automatique Architect (laboratoire Abbott, Rungis, France).

Enfin la proAMH a été mesurée comme détaillé dans la première partie de ce manuscrit. Brièvement, un Tampon phosphate salé (PBS = Phosphate Buffered Saline, 0,02M, pH=6,8, 37°C) a été ajouté à un premier échantillon de sérum de 150µl (témoin) et, dans un autre échantillon, du désoxycholate (DOC) (0,23% de concentration finale) dilué dans du PBS a été ajouté. Après une incubation de 30 minutes (en 2 fois) à 37°C, les échantillons ont été analysés pour le dosage de l'AMH par l'analyseur automatique Access-Dxi (Beckman Coulter, USA). L'échantillon témoin traité par PBS donnait le résultat de l'AMH totale tandis que l'échantillon avec le pré-traitement par DOC permettait la mesure de la proAMH seule. Les résultats sont rendus sous la forme de ratio de proAMH sur AMH total (ou IPA (index de ProAMH) = $[\text{proAMH}/\text{AMH totale}] * 100$) ou de soustraction de la valeur de la proAMH de l'AMH totale pour obtenir la valeur théorique d'AMH clivée.

Prélèvements placentaires

Les placentas ont été récupérés en salle de naissance de la Maternité de Jeanne de Flandre, placés dans un container à 4°C pendant maximum 12h après l'accouchement puis transporté à l'unité 1172 de l'INSERM où les prélèvements placentaires ont été réalisés (**Figure 2**). Cette étape a été réalisée le plus rapidement possible pour limiter toute dégradation placentaire et en particulier celle des ARNs. En pratique, 3 ou 4 cotylédons de chaque placenta (nommés A, B et C (+/-D)) ont été prélevés et disséqués, après retrait de la decidua face maternelle, pour obtenir des biopsies de trophoblaste qui ont été congelées soit dans 1ml de Trizol*, pour extraction ultérieure des ARN, soit dans un tube sec, pour de possibles études protéiques ou sur l'ADN. Pour la plupart des placentas, deux échantillons distincts de chaque cotylédon (A1, A2, B1, B2 etc.) ont été réalisés pour avoir une meilleure représentativité des expressions et sécrétions placentaires. Par ailleurs, une tranche placentaire a été congelée pour chaque placenta, pour pouvoir réaliser ultérieurement par exemple des études en immuno-histochimie.

Culture trophoblastique et traitement des puits

Pour certaines patientes, des échantillons trophoblastiques ont été cultivés pendant 4 heures à 37°C en présence d'AMH (AMH_C, R&D Systems, rhMIS 1737-MS-10) à différentes concentrations (10ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml dilué dans du PBS) ou de PBS, en atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ dans du milieu contenant du DMEM/F-12 (**Figure 2**).

Le contrôle correspond aux cellules incubées uniquement dans le milieu de culture et le PBS. A l'issue des 4 heures de culture, le milieu de culture de chaque puits a été récupéré et conservé à -80°C. Les échantillons trophoblastiques ont été rincés dans du PBS, séchés puis congelés dans 1 ml de Trizol* (Thermofisher Scientific, cat # 15596026).

Ces échantillons n'ont pas encore été traités au moment de l'écriture de ce manuscrit.

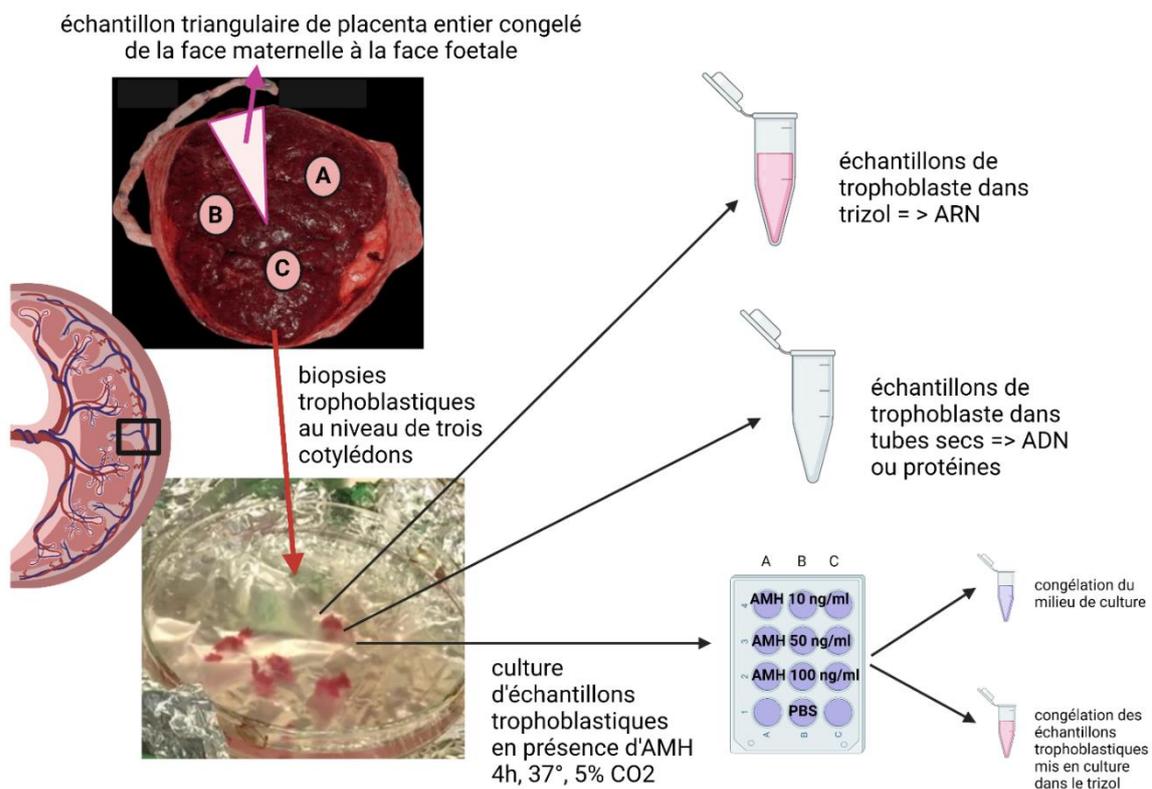


Figure 2 : Schéma des différents traitements des biopsies placentaires. Après récupération du placenta celui-ci est pesé puis des biopsies sont réalisées au niveau de trois cotylédons (A, B et C). Au sein de chacun de ces cotylédons, le trophoblaste (carré noir sur le schéma de gauche) est isolé et des échantillons trophoblastiques sont congelés à -80°C pour certains dans 1 ml de Trizol* (pour extraction d'ARN ultérieure), pour certains dans un tube sec (pour études protéiques ou d'ADN) et d'autres sont mis en culture pendant 4h à 37°C en présence de concentrations croissantes d'AMH. Après la culture les échantillons trophoblastiques de chaque condition sont congelés dans 1 ml de Trizol* et le milieu de culture dans un tube sec. Enfin, un échantillon placentaire global (le triangle du schéma) est congelé directement à -80°C. Créé avec Biorender.com

Extraction des ARN totaux

Après décongélation, les échantillons trophoblastiques ont été homogénéisés en utilisant 1 ml de Trizol* (Thermofisher Scientific, cat # 15596026) et un homogénéiseur de tissu (polytron). Puis les ARNs totaux ont été extraits avec le kit d'extraction RNeasy (RNeasy Mini Kit ; Qiagen ; cat # 74106) selon les instructions du fabricant. Les ARNs purifiés ont été élués dans 30 µl d'eau RNase free.

Synthèse des ADN complémentaires

Les ARN purifiés ont été quantifiés par densitométrie optique à 260 nm à l'aide d'un Nanodrop (logiciel ND 100/RNA-40). Pour chaque femme, nous avons utilisé une concentration équivalente d'ARN des différentes conditions pour permettre une comparaison fiable (4000 ng/ml).

La synthèse des ADN complémentaires (ADNc) est réalisée à l'aide du kit de haute capacité RNA to cDNA (Applied Biosystems, cat # 4387406) selon les instructions du fabricant. Un contrôle négatif est réalisé sans reverse transcriptase (RT-).

PCR (Polymérase Chain Reaction) quantitative en temps réel (Q-PCR)

Les ADNc des gènes d'intérêt ont été amplifiés par Q-PCR en temps réel selon la technique TaqMan sur l'appareil Applied Biosystems 7900HT (Thermofischer Scientific). Les amorces humaines d'expression génique TaqMan® (Applied Biosystems) sont résumées dans la **Table 1**.

| Nom du gène | Symbole du gène | TaqMan Assay | Gene ID |
|--|-----------------|-----------------------------------|---------|
| Hormone anti-müllérienne | AMH | Hs00174915_m1 | 268 |
| Récepteur de l'AMH de type 2 | AMHR2 | Hs01086646_g1 ou Hs00179718_m1 | 269 |
| Cytochrome P450 sous famille 11 type A1 | CYP 11A1 | Hs00167984_m1 | 1583 |
| Cytochrome P 450 sous famille 19 type A1 | CYP 19A1 | Hs00903411_m1 | 1588 |
| Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase | GAPDH | Hs02758991_g1 | 2597 |
| 3 β hydroxy-stéroïde déshydrogénase de type 2 | HSD 3B2 | Hs00605123_m1 | 3284 |
| 17 β hydroxy-stéroïde déshydrogénase de type 2 | HSD 17B2 | Hs00157993_m1 | 3294 |
| Succinate déshydrogénase complexe sous unité A | SDHA | Hs00188166_m1 | 6389 |

Table 1 : Séquences des amorces TaqMan® utilisées pour la Q-PCR

La PCR en temps réel a été réalisée sur 2 µl d'ADNc dilué au 1/10^{ème} et 8 µl d'une solution comprenant les amorces sélectionnées et le kit TaqMan Universal Master Mix II (Applied Systems, Thermofisher Scientific). Chaque mesure a été dupliquée. Le protocole de PCR comprend une étape initiale à 50°C pendant 2 minutes puis une étape d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 minutes suivie par 49 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes puis hybridation à 60°C pendant 1 minute.

Les résultats de Q-PCR ont été analysés en établissant le rapport de la concentration du transcrit du gène d'intérêt sur la concentration des transcrits des gènes de référence, ici SDHA et GAPDH (**Table 1**). Les valeurs d'expression sont exprimées relativement à la valeur dans la population témoin, placée arbitrairement à 1. Pour une meilleure représentativité de notre analyse d'expression génique placentaire, les deux échantillons de chaque cotylédon (A1 et A2, B1 et B2, C1 et C2) ont été analysés séparément pour la Q-PCR de chaque gène (gènes d'intérêt et gènes de référence) et en double. La moyenne de tous ces résultats individuels a ensuite été calculée pour donner une valeur moyenne d'expression placentaire relative du gène d'intérêt par patiente.

Analyses statistiques

Calcul du nombre de sujets nécessaires

Il est connu dans la littérature que le taux d'AMH est supérieur chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins. Dans l'étude de Pigny et al. (Pigny *et al.*, 2016), le taux d'AMH avant la grossesse était de 72,1 pmol/L (\pm 38,2) chez des femmes SOPK versus 19,9 pmol/L (\pm 5,8) chez des femmes témoins. En faisant l'hypothèse que le taux d'AMH des femmes SOPK reste supérieur au taux d'AMH des témoins au cours de la grossesse et compte tenu de la différence mise en évidence de base, nous nous attendons à un effet élevé. D'après Cohen (Cohen, 1992), une différence standardisée (taille d'effet) de 1 est considérée comme élevée. Pour mettre en évidence cette taille d'effet avec une puissance de 90% et un risque de première espèce de 5%, il est nécessaire d'inclure 23 sujets par bras. Afin de tenir compte d'un taux de perdu de vue de 20%, il faut recruter 29 patients par groupe, soit 58 patientes au total (**Figure 3**).

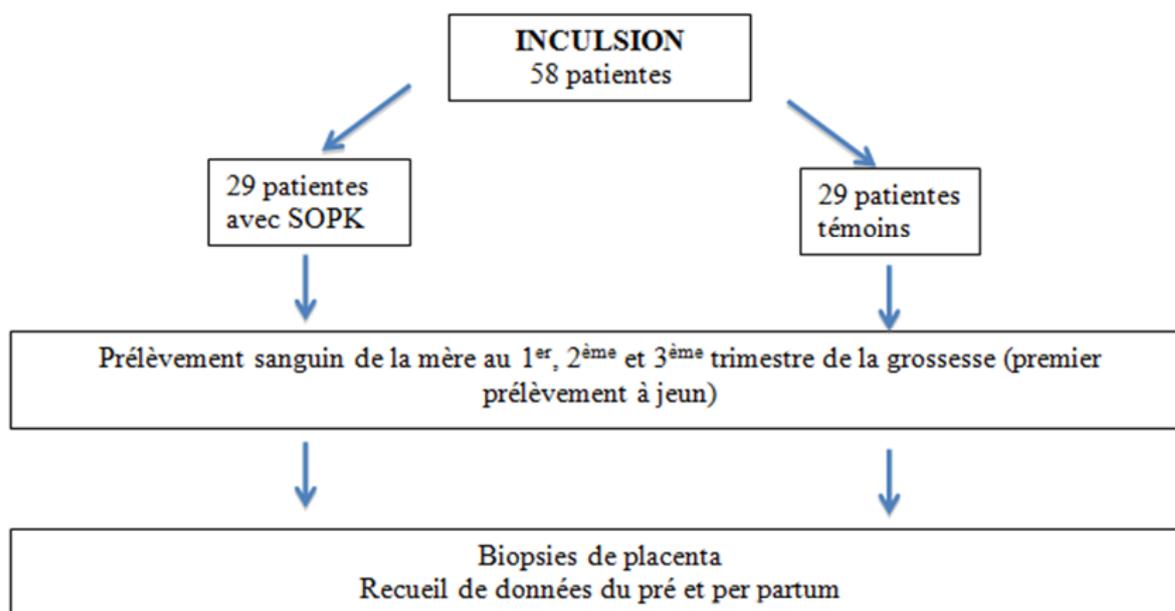


Figure 3 : Schéma de répartition des patientes à inclure et principales étapes de suivi.

Méthode et stratégie d'analyse

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SPSS 22.0 (SPSS Inc.) (Chicago, IL, USA).

Les variables qualitatives sont décrites par les effectifs et pourcentages. Les variables quantitatives sont décrites par la médiane et l'interquartile (i.e. 5^{ème} et 95^{ème} percentiles ou 10^{ème} et 90^{ème}). Les comparaisons entre deux groupes indépendants ont été réalisées par des tests de Chi2 ou de Mann Whitney et, chez une même femme au cours de la grossesse, par le test de Wilcoxon. Les corrélations entre les différents paramètres sont exprimées selon le coefficient de corrélation de Spearman (r). $P < 0,05$ est considéré comme étant significatif et un r absolu $\geq 0,4$ est considéré comme fort.

Considérations éthiques et légales

Une note d'information a été remise à la patiente (Annexe 4) et son consentement (Annexe 5) recueilli après réflexion, soit au cours de la consultation soit lors d'une consultation suivante. Les patientes sont classées en deux groupes : SOPK et témoin. La prise en charge médicale est la même dans les 2 groupes.

L'essai est mené conformément au protocole approuvé, au code de la Santé Publique, aux BPC de l'UE et aux exigences réglementaires applicables. L'essai est enregistré sur la base de données publique ClinicalTrials.gov : NCT03483792 et a bénéficié de l'accord du comité de protection des personnes (CPP) (2017-A02628-45) (Annexe 3).

Résultats

Descriptif des populations avant et pendant la grossesse

Les inclusions ont débuté le 20 avril 2018 et se sont terminées le 24 août 2021. Le descriptif de la population au 15 septembre 2021 est détaillé dans la **Figure 4**.

Au total au 15 septembre 2021, toute la population avec SOPK a été incluse (31 patientes initialement dont une exclue secondairement car ne répondant pas aux critères d'inclusion : ovaires polykystiques à l'échographie uniquement (PCOM)) et 3 patientes n'ont pas encore fini le suivi et doivent encore accoucher. Elles sont en fin de troisième trimestre de grossesse (après le dernier dosage). Dans le groupe témoin, toutes les patientes ont été incluses au premier trimestre et ont réalisé leur dosage, 13 sont encore entre le premier et le deuxième trimestre de la grossesse (en attente du bilan de deuxième trimestre), une est entre le deuxième et le troisième trimestre de la grossesse (en attente du bilan du troisième trimestre).

Au total à ce jour, 9 patientes dans le groupe SOPK et 6 patientes dans le groupe témoin ont été perdues du vue ou leur placenta n'a pas pu être récupéré. Respectivement, 14 patientes dans le groupe SOPK et 24 patientes dans le groupe témoin avaient du sérum antérieur à la grossesse encore disponible pour pouvoir réaliser les dosages des formes moléculaires de l'AMH avant la grossesse.

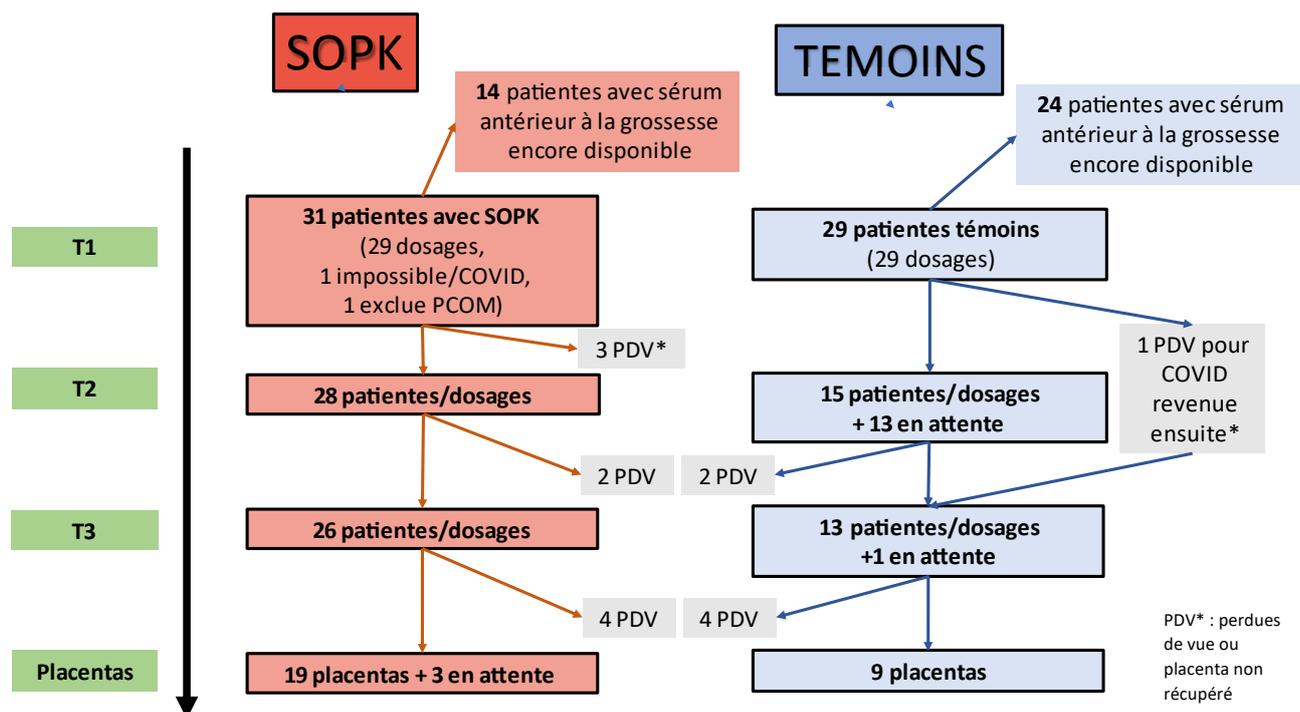


Figure 4 : Flow chart des inclusions au 15 septembre 2021. Dans le groupe SOPK toutes les patientes ont été incluses ($N=30$, 1 exclue a posteriori car erreur d'inclusion : aspect morphologique polykystique des ovaires (PCOM) seul sans SOPK) et 3 patientes sont encore en cours de suivi (fin de troisième trimestre de grossesse) et doivent encore accoucher pour terminer le suivi. Dans le groupe témoin, toutes les patientes ont été incluses, mais 14 patientes sont encore en cours de suivi (actuellement en cours de premier et deuxième trimestre de la grossesse).

Le descriptif avant la grossesse de nos populations SOPK et témoin est détaillé dans la **Table 2** et pendant la grossesse dans la **Table 3**. Lors du bilan initial avant la grossesse, les patientes avec SOPK présentaient plus de troubles du cycle et d'hyperandrogénie que les témoins ($p<0,001$). Leurs taux d'AMH (58,9 pmol/L vs 18,3 pmol/L ; $p<0,001$), de LH (5,9 UI/L vs. 3,3 UI/L ; $p=0,004$), de testostérone totale (0,35ng/ml vs. 0,29ng/ml ; $p=0,019$), d'androsténone (1,26 ng/ml vs. 0,95 ng/ml ; $p=0,014$) et leur CFA de base (57 vs. 21,5 ; $p<0,001$) étaient plus élevés que chez les témoins. La prolactine était plus élevée chez les patientes témoins mais restait dans la norme (<30 ng/ml). Dans le groupe SOPK, les phénotypes majoritaires étaient les phénotypes A (43,3%) et D (50%). Les poids et Indice de Masse Corporelle (IMC) n'étaient pas différents entre nos deux groupes ($p=0,812$ et $0,781$ respectivement). Au début de la grossesse, les patientes avec SOPK étaient significativement plus jeunes que les témoins (28 ans vs. 33 ans ; $p=0,049$) et elles obtenaient la grossesse moins souvent en Assistance Médicale à la Procréation (IIU, FIV, ICSI ou TEC) que les témoins ($p<0,001$).

| | SOPK N= 30 Med (5 ^e -95 ^e)/ N (%) | Témoins N= 29 Med (5 ^e -95 ^e)/ N (%) | p |
|---|---|--|------------------|
| Age au bilan initial (ans) | 28 (20-36) | 31 (23-38) | 0,051 |
| Poids au bilan initial (kg) | 68,5 (51,4-104,4) | 67,5 (53-105) (N=28) | 0,812 |
| IMC au bilan initial (kg/m²) | 24,5 (18,8-37,8) | 25,76 (18,5-38,9) (N=28) | 0,781 |
| Trouble du cycle (oui) | 28 (93,3%) | 0 | <0,001 |
| Hyperandrogénie clinique ou biologique (oui) | 15 (50%) | 0 | <0,001 |
| CFA total J2 | 57 (31,8-108,4) | 21,5 (11,4 -36) (N=28) | <0,001 |
| FSH J2 (UI/L) | 5,05 (3,0-8,7) (N=28) | 6,10 (1,5-9,4) (N=21) | 0,11 |
| LH J2 (UI/L) | 5,9 (1,8-11,5) (N=27) | 3,3 (1,2- 5,9) (N=16) | 0,004 |
| Œstradiol J2 (pg/ml) | 37,5 (20,9-72,2) (N=28) | 36,0 (16,3-133,3) (N=21) | 0,671 |
| AMH (pmol/L) | 58,9 (28,4-145) | 18,3 (6,5-34,1) | <0,001 |
| AMH clivée (pmol/L) | 27,8 (20,8-55,4) (N=14) | 12,2 (7,8-19,3) (N= 12) | <0,001 |
| IPA (%) | 37,06 (29,7-46,7) (N=14) | 39,9 (32,4- 45,4) (N= 12) | 0,411 |
| Testostérone totale (ng/ml) | 0,35 (0,19-0,63) (N=26) | 0,29 (0,14-0,41) (N=15) | 0,019 |
| Androsténone (ng/ml) | 1,26 (0,64-2,85) (N=26) | 0,95 (0,22-1,25) (N=15) | 0,014 |
| 17 OH P (ng/ml) | 0,53 (0,24-1,15) (N=24) | 0,39 (0,12-1,03) (N=15) | 0,33 |
| Prolactine (ng/ml) | 9 (5-35,7) (N=25) | 13 (6-21,3) (N=16) | 0,014 |
| Phénotype si SOPK | | | |
| A | 13 (43,3%) | | |
| B | 0 | | |
| C | 2 (6,7%) | | |
| D | 15 (50%) | | |
| Poids avant la grossesse (kg) | 68,0 (48,8-106,6) (N= 28) | 70,0 (50,4-99,6) (N=21) | 0,36 |
| IMC avant grossesse (kg/m²) | 24,8 (18,1-38,4) (N=28) | 28,7 (18,6-39,6) (N=21) | 0,424 |

Table 2 : Descriptif des populations SOPK et témoin avant la grossesse. SOPK : syndrome des ovaires polykystiques ; Med : médiane ; IMC : indice de masse corporelle ; CFA : compte des follicules antraux ; J2 : deuxième jour du cycle menstruel ; FSH : folliculo-stimulating hormone ; LH : luteinizing hormone ; AMH : hormone anti-müllérienne ; AMH clivé = AMH totale – pro AMH ; IPA : index de Pro AMH = (Pro AMH/AMH totale)*100 ; 17OHP : 17 hydroxy-progestérone

Pendant la grossesse, le poids, la prise de poids et l'IMC n'étaient pas différents entre femmes avec SOPK et femmes témoins (**Table 3**). Le terme à l'accouchement, les poids de naissance et le sex-ratio des enfants n'était pas non plus différent entre nos groupes.

| | SOPK Med (5 ^e -95 ^e)/ N (%) | Témoins Med (5 ^e -95 ^e)/ N (%) | p |
|---|--|---|-------------------|
| Age au début de la grossesse (ans) | 28 (21-37,4) | 33 (24,5 -39) | 0,049 |
| Mode obtention de la grossesse | N=29 | N= 29 | <0,001 |
| Spontané | 4 (16,7%) | 1 (3,4%) | |
| Induction simple | 11 (45,9%) | 0 | |
| IIU | 4 (16,7%) | 3 (10,3%) | |
| FIV ICSI | 3 (12,5%) | 11 (37,9%) | |
| TEC | 2 (8,3%) | 14 (48,3%) | |
| Au premier trimestre | <i>N=29</i> | <i>N=29</i> | |
| Poids (kg) | 70 (50,5-110,5) (N=25) | 72 (52-98,4) (N=13) | 0,451 |
| Prise de poids /avant grossesse (kg) | +1 kg (-3,4 +7,1) (N=25) | +2 kg (-4 +3) (N=13) | 0,126 |
| IMC (kg/m ²) | 25,6 (18,6-39,6) (N=25) | 29,7 (19,5 – 38,2) (N=13) | 0,372 |
| AMH (pmol/L) | 42,8 (17,0 -90,9) | 13,8 (5,5 -24,3) | <0,001* |
| AMH clivée (pmol/L) | 26,6 (11,2-56,4) (N=27) | 9,0 (4,2-15,5) (N=16) | <0,001* |
| IPA (%) | 37,82 (29,3 – 44,9) (N=27) | 37,2 (31,2 -45,8) (N=16) | 0,862* |
| Testostérone totale (ng/ml) | 0,76 (0,38-2,35) | 0,55 (0,29-1,5) | 0,022 |
| Œstradiol (pg/ml) | 1496 (455,5-3086,5) | 1426 (570,5 -3853,5) | 0,883 |
| LH (UI/L) | 0,6 (0,1-1,2) | 0,4 (0,1 – 2) | 0,018 |
| LH indosable | 1 (3,8%) | 1 (3,8%) | |
| Glycémie à jeun (g/L) | 0,80 (0,66-0,93) (N=22) | 0,80 (0,69-0,91) (N=28) | 0,977 |
| Au deuxième trimestre | <i>N=28</i> | <i>N=15</i> | |
| Poids (kg) | 74,0 (55-110,7) (N=24) | 72,0 (56-101,2) (N=11) | 0,859 |
| Prise de poids /avant grossesse (kg) | +5,5 kg (-1,5 +11,5) (N=24) | + 6 kg (+1 +9,8) (N=11) | 0,268 |
| IMC (kg/m ²) | 26,8 (20,2-39,7) (N=24) | 29,4 (20- 40,1) (N=11) | 0,644 |
| AMH (pmol/L) | 28,8 (8,8-60,1) | 12,5 (4,5-19,9) | <0,001* |
| AMH clivée (pmol/L) | 19,4 (5,3-39,5) | 7 (3 – 12,9) | <0,001* |

| | | | |
|---|---|-----------------------------------|---------------|
| IPA (%) | 35,6 (27,8-43,8) | 35,9 (28,6-46,1) | 0,376* |
| Testostérone totale (ng/ml) | 0,82 (0,40 -2,77) | 0,61 (0,23-0,87) | 0,013 |
| Œstradiol (pg/ml) | 8164,5 (3737,1 -15736,1) | 6781 (3194-15175) | 0,359 |
| LH (UI/L) | 0 (0-0,62) | 0 (0 – 0,4) | 0,822 |
| LH indosable | 18 (64,3%) | 10 (66,7%) | 0,575 |
| Au troisième trimestre | <i>N=26</i> | <i>N=13</i> | |
| Poids (kg) | 79 (61-118,8) (N=22) | 85 (59-108) (N=14) | 0,314 |
| Prise de poids /avant grossesse (kg) | +8,5 (-1,1 +16,7) (N=22) | + 10 kg (+4 +17,5) (N=14) | 0,345 |
| IMC (kg/m²) | 28,5 (22,1-42,4) (N=22) | 33,4 (22,7 – 40,8) (N=14) | 0,180 |
| AMH (pmol/L) | 18,4 (5,8-41,5) | 6,5 (4,1-10,9) | 0,002* |
| IPA (%) | 34,15 (26,2-43,2) (N=21) | 36,7 (27,6 – 47,1) | 0,263* |
| AMH clivée (pmol/L) | 12,6 (3,4-27,4) (N=21) | 4,2 (2,2 – 7,3) | 0,001* |
| Testostérone totale (ng/ml) | 0,97 (0,45-4,47) | 0,64 (0,29- 1,57) | 0,069 |
| Œstradiol (pg/ml) | 16138 (4398,2-28910,6) | 15270 (7562 -27118,4) | 0,421 |
| LH (UI/L) | 0 (0-0,67) | 0,2 (0- 0,66) | 0,537 |
| LH indosable | 15 (57,7%) | 6 (46,1%) | 0,366 |
| A l'accouchement | <i>N=22</i> | <i>N=13</i> | |
| Terme (SA, décimales) | 39,6 (35,6-41,8) | 39,9 (36,4-41,6) | 0,347 |
| Voie d'accouchement | | | 0,06 |
| AVB | 20 (76,9%) | 14 (100%) | |
| Césarienne | 6 (23,1%) | 0 | |
| Non connu | 1 | 2 | |
| Poids de l'enfant (kg) | 3375 (2424,5-3998,5) | 2880 (2580-3736) | 0,12 |
| Sexe de l'enfant | <i>N=27</i> | <i>N= 14</i> | 0,406 |
| Fille | 11 (40,7%) | 7 (50%) | |
| Garçon | 16 (59,3%) | 7 (50%) | |

Table 3 : Descriptif et suivi des populations SOPK et témoin pendant la grossesse. SOPK : syndrome des ovaires polykystiques; Med : médiane; IUI : insémination intra-utérine ; FIV/ICSI : fécondation in vitro/injection intracytoplasmique de spermatozoïde; TEC : transfert d'embryon congelé; IMC : indice de masse corporelle; CFA : compte des follicules antraux; J2 : deuxième jour du cycle menstruel ; FSH : folliculo-stimulating hormone ; LH : luteinizing hormone ; AMH : hormone anti-müllérienne ; AMH clivé = AMH totale – pro AMH ; IPA : index de Pro AMH =(Pro AMH/AMH totale)*100 ; 17OHP : 17 hydroxy-progestérone ; *p corrigé pour l'âge par une analyse univariée de variance

L'AMH et de ses formes moléculaires pendant la grossesse

Ainsi que le montre la **Table 3**, l'âge au début de la grossesse étant significativement plus faible chez les femmes avec SOPK que chez les témoins, nous avons appliqué une correction pour l'âge (*) des variables concernant l'AMH en utilisant une analyse univariée de variance (avec le logiciel SPSS) afin de pouvoir interpréter les différents dosages au cours de la grossesse.

Au sein de chaque groupe, SOPK ou témoin, les taux d'AMH et d'AMH clivée sont significativement plus faibles au troisième trimestre de la grossesse qu'avant celle-ci (respectivement chez les SOPK, $p < 0,001$ et $p = 0,005$ et chez les témoins, $p = 0,001$ et $p = 0,002$) (**Table 3 et Figures 5B et 6B**).

Le taux sérique d'AMH au troisième trimestre de la grossesse reste significativement plus élevé chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins (18,4 pmol/L vs. 6,5 pmol/L ; $p = 0,002^*$) (**Table 3 et Figure 5A**). C'est également le cas au premier et au deuxième trimestre de la grossesse (respectivement 42,8 pmol/L vs. 13,8 pmol/L ; $p < 0,001^*$ puis 28,8 pmol/L vs. 12,5 pmol/L ; $p < 0,001^*$).

A tous les temps du suivi, avant et pendant la grossesse, la quantité d'AMH clivée ($AMH_{N,C}$) est également plus élevée chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins (**Table 3 et Figure 6A**).

L'IPA (index de $ProAMH = (ProAMH/AMH_{totale}) * 100$) n'est pas différent entre femmes avec SOPK et femmes témoins, et ce à chaque temps du suivi (**Table 3 et Figure 7A**). De même, il ne se modifie pas de façon significative au cours de la grossesse chez les patientes du groupe SOPK ($p = 0,508$) ou celles du groupe témoin ($p = 0,388$) (**Figure 7B**).

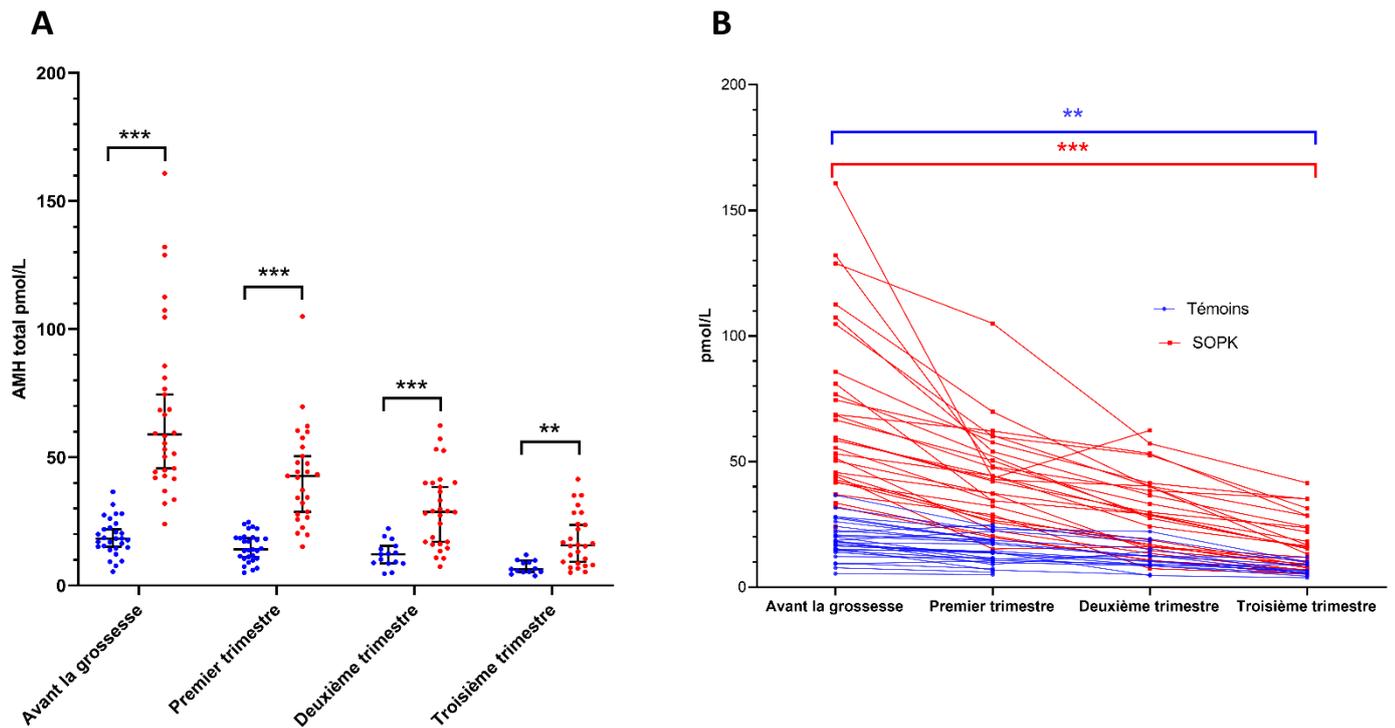


Figure 5 : AMH totale sérique (pmol/L) avant et au cours de la grossesse chez les patientes avec SOPK et les témoins. (A) Représentation des dosages individuels d'AMH chez les patientes avec SOPK en rouge et témoin en bleu à chaque temps du suivi (avant la grossesse, aux premier, deuxième et troisième trimestres de la grossesse), médiane et IC 95% en noir. Les taux d'AMH sont significativement plus élevés chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins à tous les temps du suivi après application d'une correction sur l'âge par analyse de la covariance (; $p < 0,01$; *** ; $p < 0,001$). (B) Représentation du suivi longitudinal des dosages d'AMH chez la même patiente aux quatre temps du suivi (SOPK en rouge, témoin en bleu). Les taux d'AMH au troisième trimestre de la grossesse sont significativement plus faibles que ceux d'avant la grossesse dans chacun des groupes, SOPK ou témoin (**; $p < 0,01$, *** ; $p < 0,001$).**

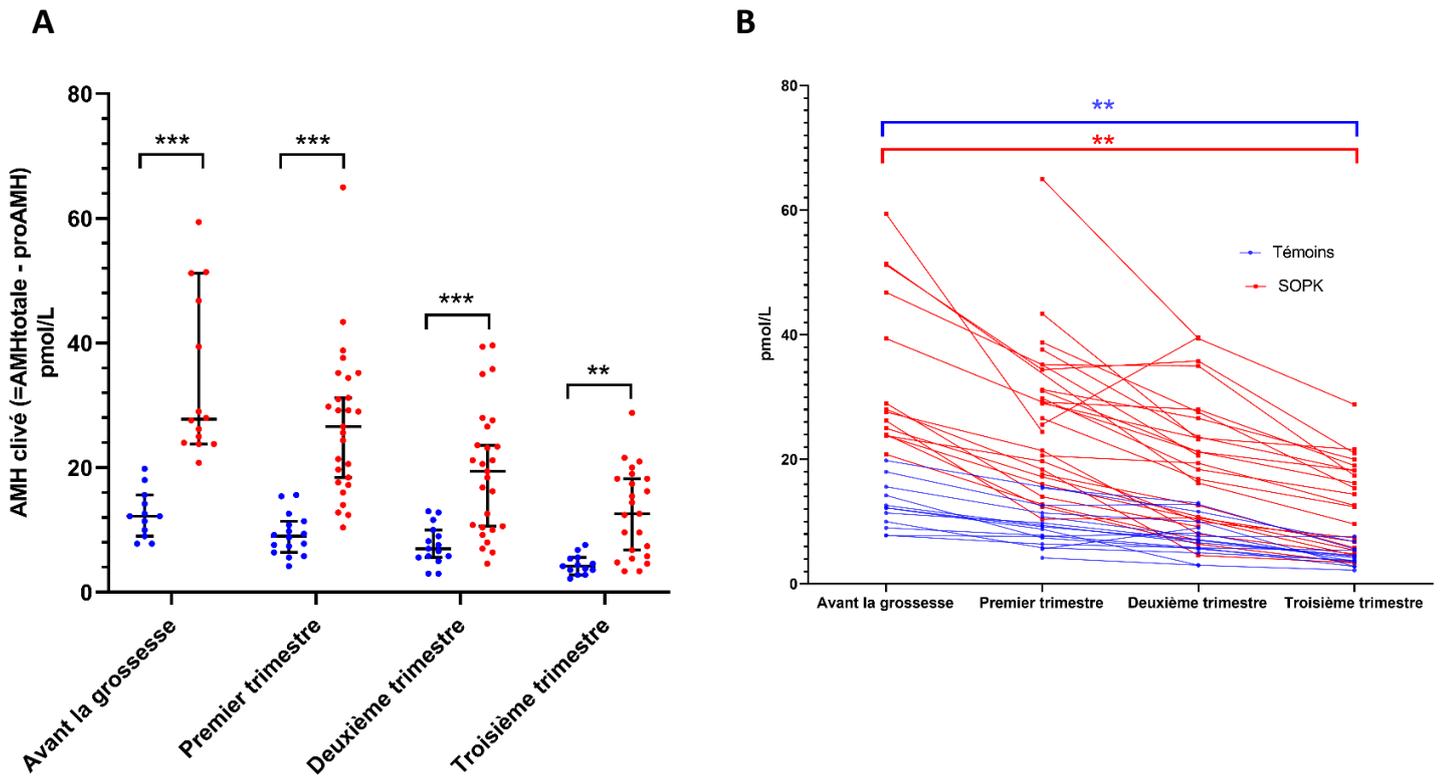


Figure 6 : AMH clivé (pmol/L) avant et au cours de la grossesse chez les patientes avec SOPK et les témoins.

Le calcul du taux d'AMH clivé est obtenu en soustrayant du taux d'AMH total (=proAMH + AMH_{N,C}), le taux de proAMH obtenu par la mesure d'AMH dans le sérum après adjonction de déoxycholate (DOC). Le DOC dissocie la liaison non covalente d'AMH_{N,C} et n'autorise donc plus le dosage que de la proAMH comme décrit dans la partie 1. (A) Représentation des dosages individuels d'AMH clivé chez les patientes avec SOPK en rouge et témoin en bleu à chaque temps du suivi (avant la grossesse, aux premier, deuxième et troisième trimestres de la grossesse), médiane et IC 95% en noir. Les taux d'AMH clivé sont significativement plus élevés chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins à tous les temps après application d'une correction sur l'âge par analyse de la covariance (** ; $p < 0,01$; *** ; $p < 0,001$). (B) Représentation du suivi longitudinal des dosages d'AMH clivé chez la même patiente aux quatre temps du suivi (SOPK en rouge, témoin en bleu). Les taux d'AMH clivé au troisième trimestre de la grossesse sont significativement plus faibles que ceux d'avant la grossesse dans chacun des groupes SOPK ou témoin (** ; $p < 0,01$).

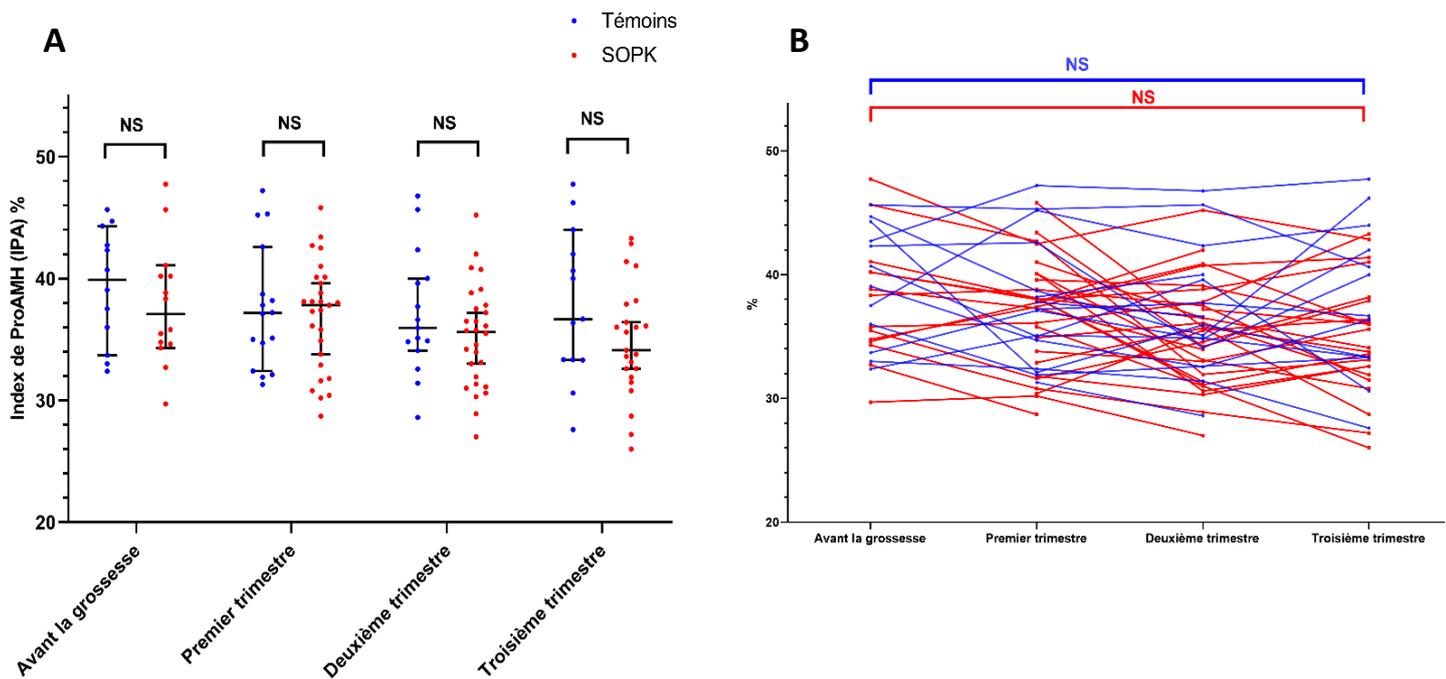


Figure 7 : Index de ProAMH (IPA) (%) avant et au cours de la grossesse chez les patientes avec SOPK et les témoins. L'IPA est obtenu en divisant le taux de proAMH, obtenu par la mesure d'AMH dans le sérum après adjonction de déoxycholate (DOC), par le taux d'AMH totale multiplié par 100 ($=(\text{proAMH}/\text{AMHtotal}) \times 100$). Le DOC dissocie la liaison non covalente de l'AMH_{N,C} et n'autorise donc plus le dosage que de la proAMH comme décrit dans la partie 1. (A) Représentation des dosages individuels d'IPA chez les patientes avec SOPK en rouge et témoin en bleu à chaque temps du suivi (avant la grossesse, aux premier, deuxième et troisième trimestres de la grossesse), médiane et IC 95% en noir. Les IPA ne sont pas significativement différents chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins à tous les temps après application d'une correction sur l'âge par analyse de la covariance (NS : non significatif). (B) Représentation du suivi longitudinal des IPA chez la même patiente aux quatre temps du suivi (SOPK en rouge, témoin en bleu). Les IPA au troisième trimestre de la grossesse ne sont pas significativement différents de ceux d'avant la grossesse dans chacun des groupes SOPK ou témoin (NS : non significatif).

Suivi des taux de LH, d'œstradiol et de testostérone totale

Le taux de LH est significativement plus bas au troisième trimestre qu'avant la grossesse chez les femmes avec SOPK ($p < 0,001$) et chez les témoins ($p = 0,012$). La LH devient indosable pour la majorité des patientes du groupe SOPK comme du groupe témoin (64,3% et 68,7% des patientes respectivement dans chacun des groupes au deuxième trimestre ; $p = 0,575$, et respectivement 57% et 46% au troisième trimestre ; $p = 0,366$). Au premier trimestre de la grossesse, le taux sérique de LH reste plus élevé chez les femmes avec SOPK que chez les témoins (0,6 UI/L vs 0,4 UI/L ; $p = 0,018$) (**Table 3 et Figure 8**), par contre, aucune différence n'est ensuite retrouvée aux deuxième et troisième trimestres de la grossesse.

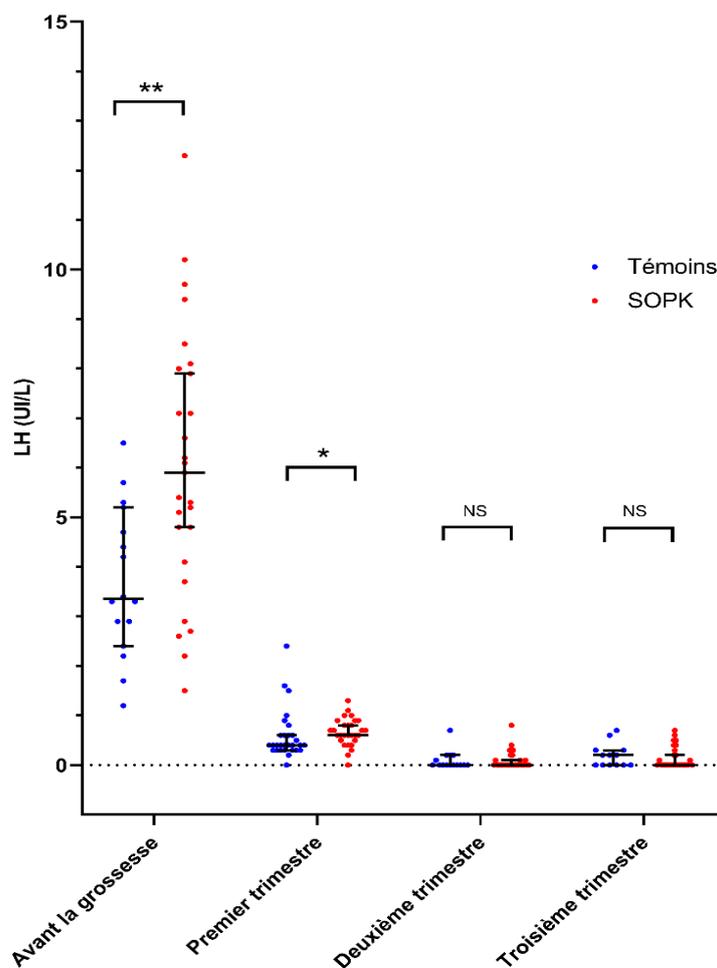


Figure 8 : Taux de LH sérique (UI/L) avant et au cours de la grossesse chez les patientes avec SOPK et les témoins. Dosages de LH chez les patientes avec SOPK en rouge et témoin en bleu à chaque temps du suivi (avant la grossesse, aux premier, deuxième et troisième trimestres de la grossesse), médiane et IC 95% en noir. Les taux de LH sont significativement plus élevés chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins avant la grossesse et au premier trimestre mais plus après (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; NS : non significatif)

Par contre le taux d'œstradiol augmente significativement dans chacun des deux groupes (chez les SOPK $p < 0,001$ et chez les témoins $p = 0,005$) tout au long de la grossesse mais n'est pas significativement différent entre les femmes avec SOPK ou les témoins à aucun des quatre temps du suivi (**Tables 2 et 3, Figure 9**).

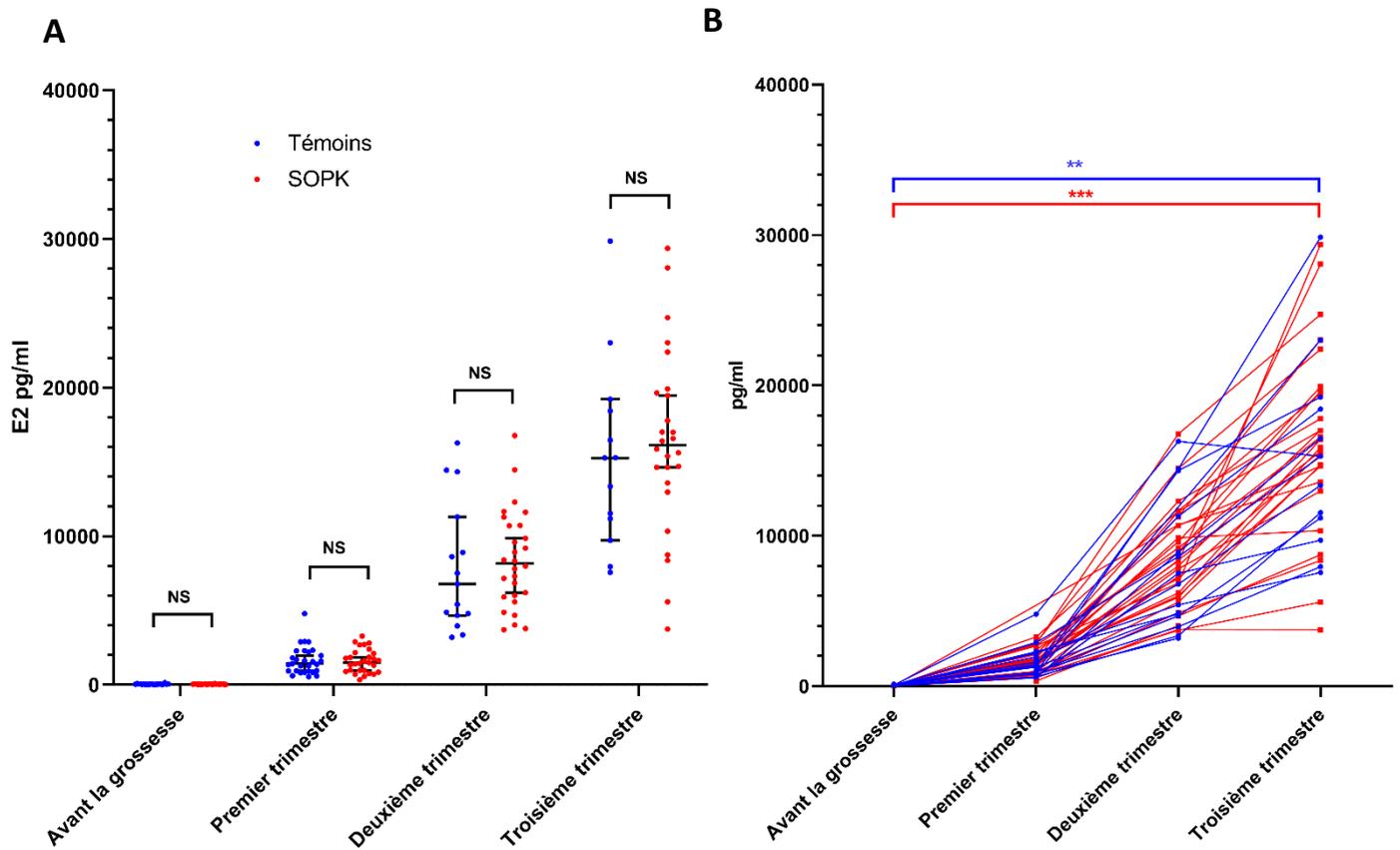


Figure 9 : Taux d'œstradiol (E2) sérique (pg/mL) avant et au cours de la grossesse chez les patientes avec SOPK et les témoins. (A) Représentation des dosages individuels d'E2 chez les patientes avec SOPK en rouge et témoin en bleu à chaque temps du suivi (avant la grossesse, aux premier, deuxième et troisième trimestres de la grossesse), médiane et IC 95% en noir. Les taux d'E2 ne sont pas significativement différents chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins à tous les temps du suivi (NS : non significatif). (B) Représentation du suivi longitudinal des dosages d'E2 chez la même patiente aux quatre temps du suivi (SOPK en rouge, témoin en bleu). Les taux d'E2 au troisième trimestre de la grossesse sont significativement plus élevés que ceux d'avant la grossesse dans chacun des groupes, SOPK ou témoin (; $p < 0,01$; *** ; $p < 0,001$).**

Dans chaque groupe, SOPK ou témoin, le taux de testostérone totale est significativement plus élevé au troisième trimestre de la grossesse qu'avant celle-ci (respectivement $p < 0,001$ et $p = 0,018$) (**Figure 10B**). Le taux de testostérone totale reste plus élevé chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins aux premier (0,76 ng/ml vs 0,55 ng/ml ; $p = 0,022$) et deuxième trimestres de la grossesse (0,82 ng/ml vs 0,61 ng/ml ; $p = 0,013$). Au troisième trimestre, il n'est plus significativement différent entre les femmes avec SOPK et les témoins (0,97 ng/ml vs 0,64 ng/ml ; $p = 0,069$) (**Tables 2 et 3, Figure 10A**).

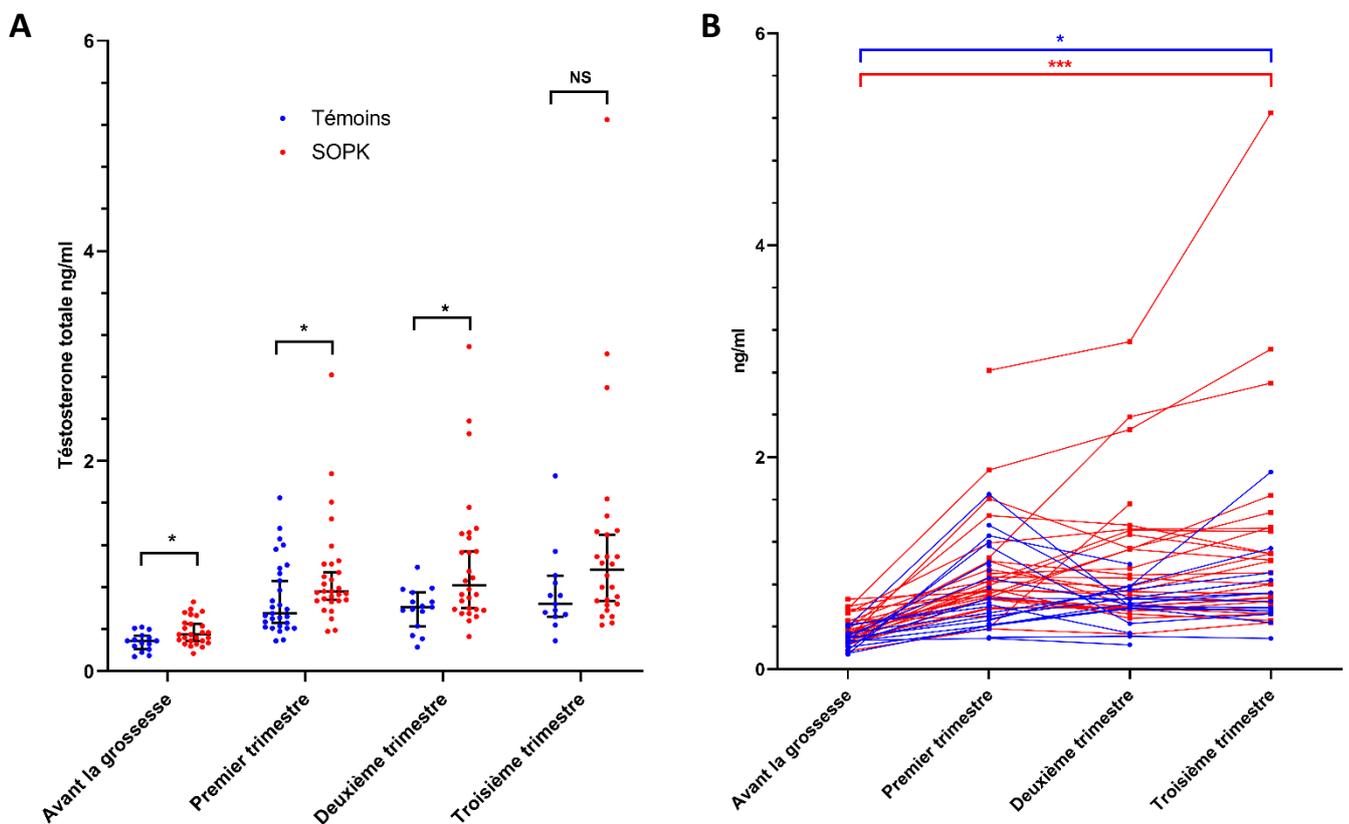


Figure 10 : Taux de testostérone totale sérique (ng/ml) avant et au cours de la grossesse chez les patientes avec SOPK et les témoins. (A) Représentation des dosages individuels de testostérone totale chez les patientes avec SOPK en rouge et témoin en bleu à chaque temps du suivi (avant la grossesse, aux premier, deuxième et troisième trimestres de la grossesse), médiane et IC 95% en noir. Les taux de testostérone totale sont significativement plus élevés chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins à tous les temps du suivi sauf au troisième trimestre de la grossesse (* $p < 0,05$; NS : non significatif). (B) Représentation du suivi longitudinal des dosages de testostérone totale chez la même patiente aux quatre temps du suivi (SOPK en rouge, témoin en bleu). Les taux de testostérone totale au troisième trimestre de la grossesse sont significativement plus élevés que ceux d'avant la grossesse dans chacun des groupes, SOPK ou témoin (*; $p < 0,05$, ***; $p < 0,001$).

Comparaison des femmes obèses/en surpoids ou de poids normal avant la grossesse

Au vu des résultats de notre étude précédente sur les formes moléculaires de l'AMH qui sont plutôt dépendantes de l'IMC que du statut « SOPK » (Peigné *et al.*, 2020), nous avons voulu regarder, en particulier, les résultats des différentes formes moléculaires de l'AMH pendant la grossesse en fonction de l'IMC avant celle-ci. Les patientes ont été regroupées en deux groupes : les patientes obèses ou en surpoids (IMC $>25\text{kg/m}^2$) et les patientes avec un IMC normal (IMC $\leq 25\text{kg/m}^2$) à la dernière mesure du poids avant la grossesse. La proportion de patientes porteuses d'un SOPK dans chacun de ces groupes n'était pas différente.

Avant la grossesse, l'IPA était significativement plus bas chez les femmes obèses ou en surpoids que chez les femmes de poids normal (35,8% vs. 41,2% ; $p=0,04$) (**Table 4**). Au cours de la grossesse, plus aucune différence n'est notée pour l'IPA, en revanche l'AMH totale et sa forme clivée sont plus basses chez les femmes obèses ou en surpoids que chez les femmes de poids normal (**Table 5 et Figure 11**). Ainsi au troisième trimestre de la grossesse chez les femmes obèses/en surpoids ou de poids normal, l'AMH totale est, respectivement, à 6,8 pmol/L vs 15,3 pmol/L ; $p=0,008$ et l'AMH clivée à 4,5 pmol/L vs. 13,5 pmol/L ; $p=0,013$).

Le taux de LH est plus faible au premier trimestre chez les femmes obèses ou en surpoids que chez les femmes de poids normal (0,4 UI/L vs. 0,6 UI/L ; $p=0,038$). Au troisième trimestre, le taux d'œstradiol est plus faible chez les femmes obèses ou en surpoids (13580 pg/ml vs. 16522,5pg/ml ; $p=0,029$) (**Table 5**). Aucune différence n'apparaît entre les groupes avant et pendant la grossesse concernant le taux de testostérone totale.

Au cours de la grossesse, la prise de poids totale au troisième trimestre de la grossesse est plus faible chez les femmes obèses ou en surpoids avant la grossesse que chez les femmes de poids normal (+8 kg vs +11kg ; $p=0,049$) (**Table 5**).

| | Obèses ou surpoids avant Grossesse | Poids normal avant Grossesse | p |
|--|---|---|------------------|
| | N= 26 | N= 30 | |
| | Med (5^e-95^e) N (%) | Med (5^e-95^e) N (%) | |
| Age au bilan initial (ans) | 29,5 (20-38,6) | 30 (22,9-36) | 0,967 |
| Poids au bilan initial (kg) | 85 (63,0-106,9) | 58,2 (51,6-82,4) | <0,001 |
| IMC au bilan initial (kg/m ²) | 31,0 (25,0-40,7) | 22,3 (18,5- 24,8) | <0,001 |
| Trouble du cycle (oui) | 10 (38,5%) | 16 (53,3%) | 0,199 |
| Hyperandrogénie clinique ou biologique (oui) | 7 (26,9%) | 7 (23,3%) | 0,498 |
| CFA total J2 | 32,5 (11,5-93,7) (N=24) | 36 (14,5-105) (N=28) | 0,748 |
| FSH J2 (UI/L) | 5,1 (2,7-8,8) (N=21) | 5,45 (2,1-9,3) (N=25) | 0,643 |
| LH J2 (UI/L) | 3,3 (1,2-10,2) (N=19) | 5,3 (2,3-9,6) (N=22) | 0,073 |
| Œstradiol J2 (pg/ml) | 36 (16,3-80,1) (N=21) | 37,0 (19,3-118,0) (N=25) | 0,708 |
| AMH (pmol/L) | 29,5 (10,4-131,4) | 42,8 (7,7-143,6) | 0,153 |
| AMH clivée (pmol/L) | 23,8 (7,8-48,6) (N=15) | 19,4 (7,8-50,0) (N=10) | 0,934 |
| IPA (%) | 35,8 (29,8 -44,8) (N=15) | 41,2 (34,3-47,5) (N=10) | 0,04 |
| Testostérone totale (ng/ml) | 0,34 (0,14-0,57) (N=18) | 0,31 (0,15-0,54) (N=21) | 0,22 |
| Androsténone (ng/ml) | 1,15 (0,22-2,6) (N=18) | 1,0 (0,5-2,4) (N=21) | 0,155 |
| 17 OH P (ng/ml) | 0,43 (0,12-0,97) (N=19) | 0,51 (0,29-1,1) (N=20) | 0,822 |
| Prolactine (ng/ml) | 10 (5,0-24,8) (N=20) | 10,5 (5,0-38,4) (N=19) | 0,888 |
| SOPK | 11 (42,3%) | 17 (56,7%) | 0,421 |
| Phénotype si SOPK | | | 0,510 |
| | A | 6 (54,5%) | 6 (35,3%) |
| | B | 0 | 0 |
| | C | 1 (9,1%) | 1 (5,8%) |
| | D | 4 (36,4%) | 10 (58,9%) |

Table 4 : Descriptif de la population avant la grossesse obèse/en surpoids ou de poids normal. SOPK : syndrome des ovaires polykystiques ; Med : médiane ; IMC : indice de masse corporelle ; CFA : compte des follicules antraux ; J2 : deuxième jour du cycle menstruel ; FSH : folliculo-stimulating hormone ; LH : luteinizing hormone ; AMH : hormone anti-müllérienne ; AMH clivé = AMH totale – proAMH ; IPA : index de Pro AMH = (Pro AMH/AMH totale)*100 ; 17OHP : 17 hydroxy-progestérone.

| | Obèses ou surpoids avant Grossesse N= 26 Med (5 ^e -95 ^e) N (%) | Poids normal avant Grossesse N= 30 Med (5 ^e -95 ^e) N (%) | p |
|---|--|--|------------------|
| Avant la grossesse | <i>N=26</i> | <i>N=30</i> | |
| Age au début de la grossesse (ans) | 30,5 (21 -39,9) | 31 (24,6-36,4) | 0,792 |
| Poids avant la grossesse (kg) | 84,5 (67-112,7) | 59 (48,7-76,2) | <0,001 |
| IMC avant grossesse (kg/m²) | 31,1 (26,4 -40,6) | 22,0 (17,8-25,6) | <0,001 |
| Mode obtention de la grossesse | | | 0,908 |
| Spontané | 2 (6,7%) | 3 (9,7%) | |
| Induction simple | 6 (23,1%) | 9 (29,0%) | |
| IIU | 4 (15,4%) | 3 (9,7%) | |
| FIV ICSI | 6 (23,1%) | 8 (25,8%) | |
| TEC | 8 (30,8%) | 7 (22,6%) | |
| Au premier trimestre | <i>N=25</i> | <i>N=30</i> | |
| Poids (kg) | 88 (66-103,6) (N=17) | 59 (50,1-81,3) (N=21) | <0,001 |
| Prise de poids /avant grossesse (kg) | +1 (-4 +3) (N=17) | +2 (-3,8 +8,2) (N=21) | 0,211 |
| IMC (kg/m²) | 31,7 (26 -40,4) (N=17) | 21,8 (18,3-26,7) (N=21) | <0,001 |
| AMH (pmol/L) | 18,5 (7,0-48,6) | 27 (7,2-83,0) | 0,038 |
| IPA (%) | 36,6 (30,2 -45,1) (N=20) | 38,1 (30,5-46,9) (N=22) | 0,066 |
| AMH clivée (pmol/L) | 13,2 (4,3 -34,9) (N=20) | 25,6 (5,7-60,7) (N=22) | 0,018 |
| Testostérone totale (ng/ml) | 0,67 (0,33-1,18) | 0,74 (0,34 -2,1) | 0,966 |
| Œstradiol (pg/ml) | 1277 (416,9 – 4044,4) | 1650 (561,8-3057,6) | 0,052 |
| LH (UI/L) | 0,4 (0,06 – 2,16) | 0,6 (0,18-1,38) | 0,038 |
| LH indosable | 1 (4%) | 1 (3,3%) | |
| Glycémie à jeun (g/L) | 0,78 (0,66-0,92) (N=22) | 0,82 (0,70-0,92) (N=26) | 0,061 |
| Au deuxième trimestre | <i>N= 20</i> | <i>N=23</i> | |
| Poids (kg) | 89,5 (72 – 108,5) (N=14) | 65 (55-83,6) (N=21) | <0,001 |
| Prise de poids /avant grossesse (kg) | +5 (-2 +8,5) (N=14) | +6kg (+1,1 +12,4) (N=21) | 0,334 |
| IMC (kg/m²) | 32,9 (29,3 -40,8) (N=14) | 24,2 (20,0-27,7) (N=21) | <0,001 |
| AMH (pmol/L) | 15,1 (4,5 -57,9) | 25,3 (8,9-58,2) | 0,027 |
| IPA (%) | 36,2 (27,0 -45,4) | 35,6 (29,4 – 43,8) | 0,846 |

| | | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------|
| AMH clivée (pmol/L) | 9,6 (3 – 39,0) | 19,4 (5,8 – 39,6) | 0,006 |
| Testostérone totale (ng/ml) | 0,71 (0,31 -2,22) | 0,68 (0,25-2,91) | 0,942 |
| Œstradiol (pg/ml) | 6372 (3381,1 -16075,4) | 8503,5 (3339,0 – 16196,5) | 0,093 |
| LH (UI/L) | 0 (0 -0,69) | 0 (0-0,67) | 0,164 |
| LH indosable | 11 (55%) | 17 (73,9%) | 0,114 |
| Au troisième trimestre | <i>N=17</i> | <i>N=22</i> | |
| Poids (kg) | 92,5 (78-112,4) | 69 (59-86) (N=19) | <0,001 |
| Prise de poids /avant grossesse (kg) | +8 (-1,5 +14,4) | +11 (+5 +17) | 0,049 |
| IMC (kg/m ²) | 34,6 (28,7 -42,0) | 26,6 (22,1 – 28,7) | <0,001 |
| AMH (pmol/L) | 6,8 (4,1 – 18,8) | 15,3 (4,4-42,9) | 0,008 |
| IPA (%) | 34,7 (27,6 -42,5) (N=16) | 35,8 (26,0-47,6) (N=20) | 0,937 |
| AMH clivée (pmol/L) | 4,5 (2,2 -14,4) (N=16) | 13,5 (2,8 – 28,4) (N=20) | 0,013 |
| Testostérone totale (ng/ml) | 0,84 (0,29-2,1) | 0,76 (0,44 – 4,87) | 0,723 |
| Œstradiol (pg/ml) | 13580 (5589,0-19977,8) | 16522,5 (4447,5 -29777,5) | 0,029 |
| LH (UI/L) | 0,1 (0- 0,62) | 0 (0-0,68) | 0,769 |
| LH indosable | 8 (47,0%) | 13 (59,1%) | 0,336 |
| A l'accouchement | <i>N=20</i> | <i>N=20</i> | |
| Terme (SA, décimales) | 39,7 (36,4 -41,3) | 39,8 (35,3-41,9) | 0,741 |
| Voie d'accouchement | <i>N=18</i> | <i>N=18</i> | 0,448 |
| AVB | 15 | 18 | |
| Césarienne | 3 | 2 | |
| G en cours | 6 | 10 | |
| Non connu | 2 | 0 | |
| Poids de l'enfant (kg) | 3200 (2690 -3960) (N=17) | 3252,5 (2420- 873) (N=18) | 0,934 |
| Sexe de l'enfant | <i>N=19</i> | | 0,208 |
| Fille | 7 | 11 | |
| Garçon | 12 | 9 | |

Table 5 : Descriptif et suivi des patientes obèses/en surpoids et de poids normal au cours de la grossesse.

SOPK : syndrome des ovaires polykystiques; Med : médiane; IIU : insémination intra-utérine ; FIV/ICSI : fécondation in vitro/injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde; TEC : transfert d'embryon congelé; IMC : indice de masse corporelle; CFA : compte des follicules antraux; J2 : deuxième jour du cycle menstruel ; FSH : folliculo-stimulating hormone ; LH : luteinizing hormone ; AMH : hormone anti-müllérienne ; AMH clivée = AMH totale – pro AMH ; IPA : index de Pro AMH =(Pro AMH/AMH totale)*100 ; 17OHP : 17 hydroxy-progestérone.

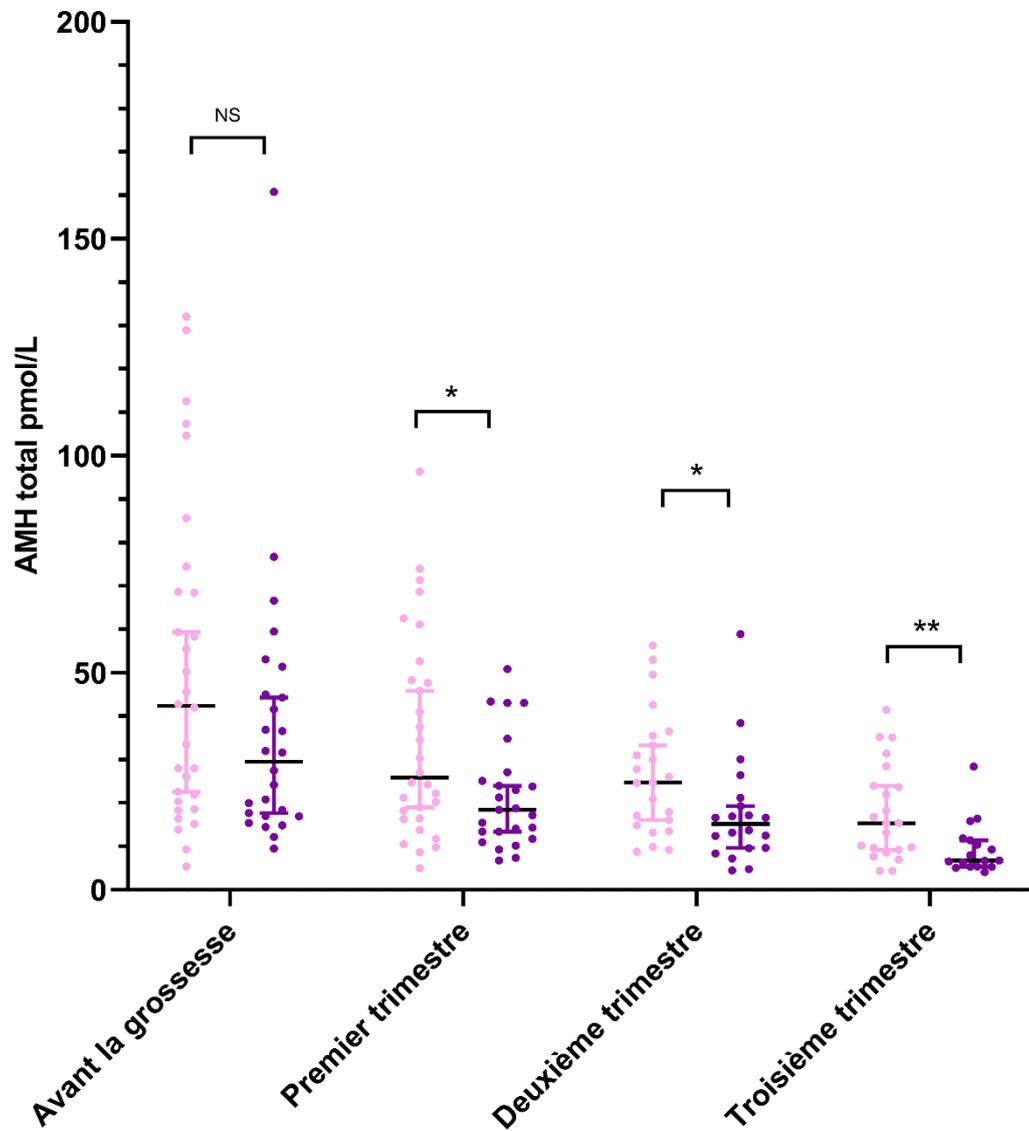


Figure 11 : AMH totale sérique (pmol/L) avant et au cours de la grossesse chez les patientes Obèses/en surpoids ou de poids normal avant la grossesse. Représentation des dosages individuels d'AMH chez les patientes obèses/en surpoids avant la grossesse en violet et de poids normal en rose à chaque temps du suivi (avant la grossesse, aux premier, deuxième et troisième trimestres de la grossesse), médiane et IC 95% en noir. Les taux d'AMH sont significativement plus élevés chez les femmes avec un poids normal que chez les femmes témoins à tous les temps du suivi pendant la grossesse mais pas avant celle-ci (* ; $p < 0,05$; ** ; $p < 0,01$; NS : non significatif).

Sous-groupes SOPK ou témoin chez les femmes obèses/en surpoids ou de poids normal avant la grossesse

Femmes de poids normal avant la grossesse

Chez les femmes de poids normal avant la grossesse, les valeurs d'AMH totale et d'AMH clivée restent plus élevées chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins avant et tout au long de la grossesse. Avec pour l'AMH totale, avant la grossesse des valeurs de 68,5 pmol/L vs. 18,6 pmol/L ($p < 0,001$), au premier trimestre de 47,7 pmol/L vs. 16,3 pmol/L ($p < 0,001$), puis 30 pmol/L vs. 13,5 pmol/L ($p = 0,001$) au deuxième trimestre et à 18,2 pmol/L vs. 9,7 pmol/L ($p = 0,017$) au troisième trimestre (**Figure 12, gauche**). Les valeurs d'AMH clivée sont également plus élevées avant et tout au long de la grossesse avec des p , respectivement, avant la grossesse à 0,009, au premier trimestre $< 0,001$, au deuxième 0,003 et au troisième 0,003. L'IPA est plus élevé chez les témoins uniquement au troisième trimestre (44% vs. 33,7% ; $p = 0,003$), mais avec uniquement 5 dosages chez les témoins.

La testostéronémie totale est significativement plus élevée chez les femmes avec SOPK que chez les témoins au premier trimestre de la grossesse (0,87 ng/ml vs. 0,46 ng/ml) ($p = 0,008$) tout comme la LH (0,8 UI/L vs. 0,5 UI/L) ($p = 0,033$) mais ce n'est plus le cas au cours du suivi ultérieur de la grossesse.

Femmes obèses ou en surpoids avant la grossesse

Chez les femmes obèses ou en surpoids avant la grossesse, les dosages d'AMH totale restent plus élevés chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins avant la grossesse (51,4 pmol/L vs. 17,7 pmol/L ; $p < 0,001$) et aux premier (30,9 pmol/L vs. 13,4 pmol/L ; $p < 0,001$) et deuxième trimestres de la grossesse (17,2 pmol/L vs. 9,7 pmol/L ; $p = 0,017$) mais ne sont plus différent au troisième trimestre de la grossesse (10,4 pmol/L vs. 6,4 pmol/L ; $p = 0,112$) (**Figure 12**). L'AMH clivée présente également la même dynamique avec des p , respectivement, avant la grossesse à 0,001, au premier trimestre à 0,001, au deuxième à 0,025 et non significativement différent au troisième à 0,155. L'IPA n'est jamais significativement différent à aucun des temps avant et pendant la grossesse.

La testostéronémie totale est significativement plus élevée chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins au deuxième trimestre de la grossesse (0,89 ng/ml vs. 0,59 ng/ml ; $p = 0,03$), mais à aucun autre temps du suivi avant et pendant la grossesse. Il n'y a pas non plus

de différence à aucun temps du suivi avant et pendant la grossesse entre les femmes avec SOPK et les témoins pour les taux d'œstradiol et de LH.

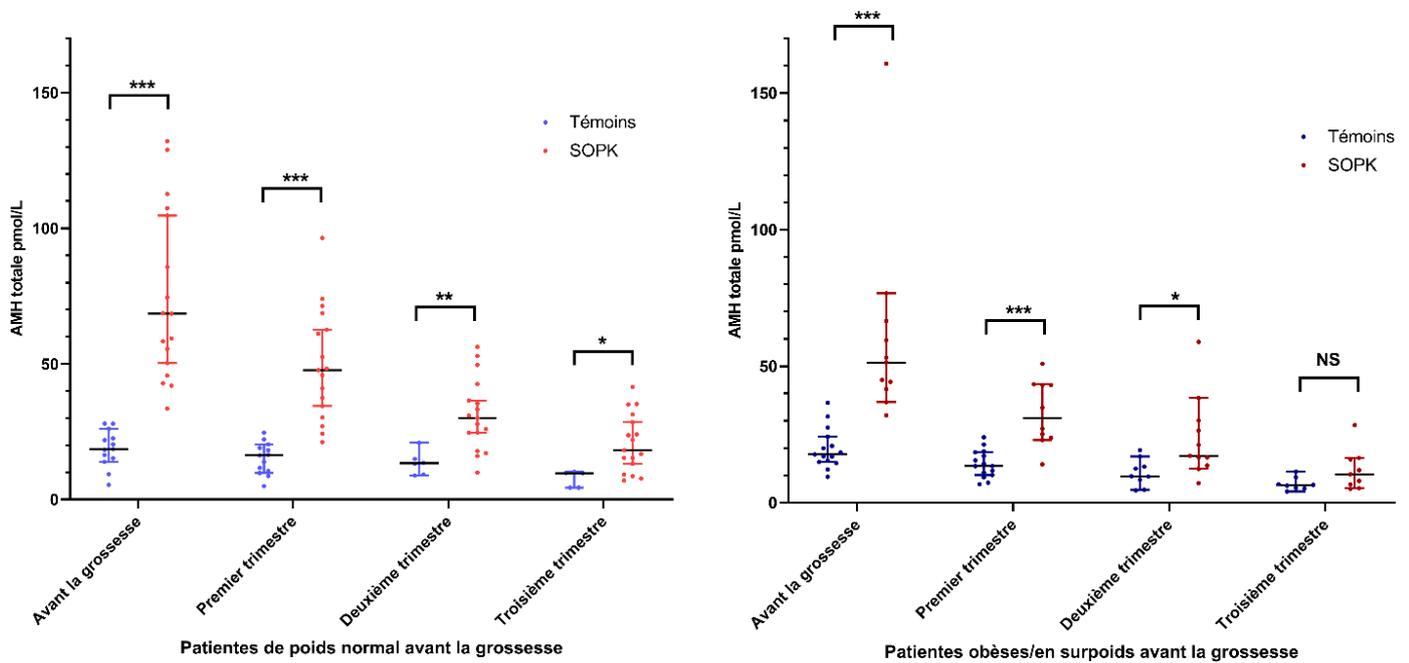


Figure 12 : AMH totale sérique (pmol/L) avant et au cours de la grossesse chez les patientes de poids normal avant la grossesse ou obèses/en surpoids, avec SOPK ou témoins. Représentation des dosages individuels d'AMH chez les patientes obèses/en surpoids avant la grossesse (à droite) et de poids normal (à gauche) à chaque temps du suivi (avant la grossesse, aux premier, deuxième et troisième trimestres de la grossesse). Au sein de chaque sous-groupe de poids, les valeurs individuelles d'AMH sont représentées en bleu pour les témoins et en rouge pour les femmes avec SOPK, médiane et IC 95% en noir. Les taux d'AMH sont significativement plus élevés chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins dans chacun des deux sous-groupes, sauf au troisième trimestre de la grossesse chez les patientes obèses/en surpoids (* ; $p < 0,05$; ** ; $p < 0,01$; NS : non significatif).

Evolution de l'AMH et de ses formes moléculaires, de l'œstradiol, de la testostérone totale et de la LH en fonction du phénotype de SOPK

Nous avons ensuite réalisé une analyse selon les sous-groupes phénotypiques des patientes avec SOPK. Comme seules 2 patientes présentaient le phénotype C, la comparaison a été effectuée uniquement entre les phénotypes A (N=13) et D (N=15). Aucune différence n'a été notée sur tous les paramètres testés (ceux décrits en Tables 2 et 3 ou 4 et 5) entre les femmes de phénotype A ou D.

Evolution de l'AMH et de ses formes moléculaires, de l'œstradiol, de la testostérone totale et de la LH en fonction du sexe fœtal

En fonction du sexe fœtal, nous avons analysé les différents résultats sur l'ensemble de la population. Il n'y avait pas de différence de proportion de SOPK entre femmes enceintes d'un garçon ou d'une fille ($p=0,659$). Au total, les patientes qui portaient un garçon (N=22) étaient plus jeunes que les patientes portant une fille (N=19) (28 ans vs 33 ans ; $p=0,049$) et elles avaient un poids ($p=0,038$) et un IMC supérieurs ($p=0,022$) avant la grossesse. L'IMC des patientes portant un garçon restait plus élevé tout au long de la grossesse (respectivement à chaque trimestre $p=0,027$; $p=0,035$, $p=0,026$). Aucune différence de taux d'AMH et de ses formes moléculaires, de LH ou d'œstradiol n'était notée entre ces deux groupes à tous les temps du suivi avant et pendant la grossesse. En revanche, la testostéronémie totale était plus élevée chez les femmes porteuses d'un garçon aux deuxième (0,92 ng/ml vs. 0,61 ng/ml ; $p=0,005$) et troisième (0,64 ng/ml vs. 1,09 ng/ml ; $p<0,001$) trimestres de la grossesse que chez celles portant des filles.

Nous avons ensuite réalisé une analyse en sous-groupes selon le sexe fœtal. Parmi les femmes portant un garçon, il y avait 7 témoins et 16 patientes avec SOPK. Les patientes avec SOPK étaient plus minces que les patientes témoins à tous les temps du suivi. Les taux d'AMH et d'AMH clivé restaient significativement plus élevés tout au long de la grossesse chez les patientes avec SOPK portant un garçon mais de façon non significative au troisième trimestre ($p=0,059$ et $p=0,065$). Il n'y avait pas de différence du taux de testostérone circulant sauf au deuxième trimestre de la grossesse (plus élevé dans le groupe SOPK). Chez les femmes portant une fille, il y avait 7 femmes témoins et 11 porteuses d'un SOPK. Avant et pendant la grossesse, les taux d'AMH et de sa forme clivée restaient plus importantes chez les femmes avec SOPK

que chez les témoins à tous les temps du suivi et ce de façon significative ($p < 0,001$). Aucune différence n'était notée concernant les taux de testostérone circulants.

Corrélations

Dans la population générale, au troisième trimestre de la grossesse, l'IPA, tout comme le taux d'AMH totale et l'AMH clivée, n'est corrélé à aucun des paramètres testés : poids et IMC au troisième trimestre ou avant la grossesse, taux de testostérone totale, d'œstradiol ou de LH au troisième trimestre ou enfin la prise de poids totale au troisième trimestre de la grossesse.

Expression génique placentaire

Les données actuellement disponibles sur l'expression placentaire des différents gènes entre femmes avec SOPK et femmes témoins sont encore parcellaires. Aucune analyse sur les cultures placentaires n'a encore été effectuée.

Sont donc présentés ici les résultats des analyses sur les placentas de 22 femmes : 14 avec SOPK et 8 témoins pour les gènes CYP 11A1 et 3 B HSD2. Pour les gènes CYP 19A1, 17 BHSD2, AMH et AMHR2 seuls les placentas de 3 femmes témoins et de 13 femmes avec SOPK ont été analysés à ce jour.

Les gènes des enzymes de la stéroïdogénèse étudiés CYP 11A1, 3 B HSD2, CYP 19A1 et 17 BHSD2 sont tous fortement exprimés dans les placentas humains. L'AMHR2 est également exprimé, à un plus faible niveau que les gènes de la stéroïdogénèse. En revanche, aucune expression de l'AMH n'a été retrouvée dans les placentas humains étudiés.

Aucune différence d'expression de ces 5 gènes n'a été trouvée au niveau du placenta entre des femmes avec SOPK et des femmes témoins (**Figure 13**).

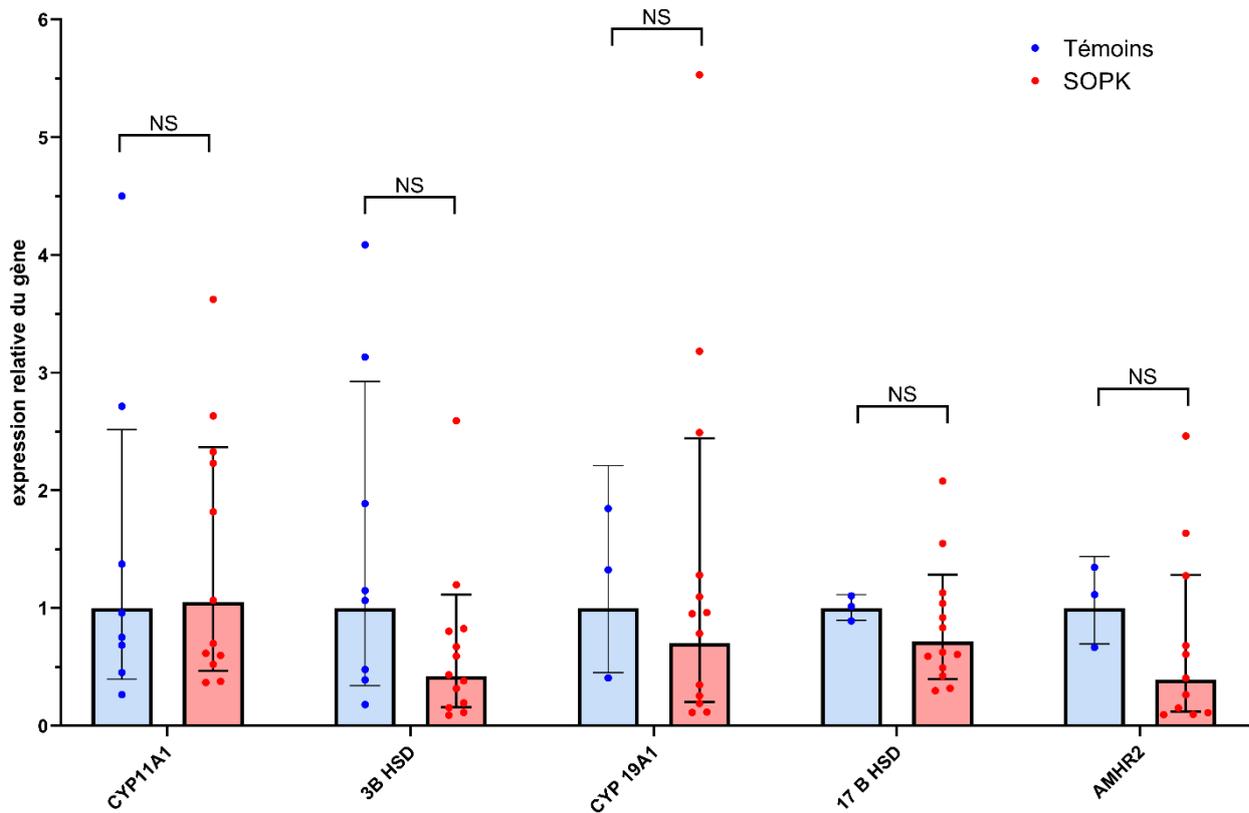


Figure 13 : Expression placentaire des gènes des enzymes de la stéroïdogénèse et de l'AMHR2.

L'expression placentaire des gènes dans le placenta des femmes avec SOPK (en rouge) est exprimée relativement à l'expression dans le placenta de femmes témoins (en bleu), fixée arbitrairement à 1. AMHR2 : Récepteur de l'AMH de type 2 ; CYP 11A1 : Cytochrome P450 sous famille 11 type A1 ; CYP19A1 : Cytochrome P 450 sous famille 19 type A1 ; 3B HSD : 3 β hydroxy-stéroïde déshydrogénase de type 2 ; 17B HSD : 17 β hydroxy-stéroïde déshydrogénase de type 2 ; NS : non significatif.

Discussion

Dans ce travail unique de suivi dynamique longitudinal de femmes enceintes avec ou sans SOPK tout au long de la grossesse, nous avons montré que, même s'ils diminuaient de façon significative, les taux d'AMH et d'AMH clivée, bioactive, plus élevés avant la grossesse chez les femmes avec SOPK que chez les témoins, restaient plus élevés chez les femmes avec SOPK et ce jusqu'au troisième trimestre de la grossesse.

Ceci confirme le premier élément de notre hypothèse : un taux circulant d'AMH, et en particulier de sa forme clivée, restant plus élevé chez les patientes avec SOPK en fin de grossesse, pourrait avoir une action de modification de l'environnement hormonal *in utero* à l'origine de l'héritabilité du SOPK, comme cela a été le cas dans le modèle expérimental de la souris pAMH (Tata *et al.*, 2018). Des études antérieures, transversales ou longitudinales partielles, avaient montré également que les taux d'AMH étaient plus élevés chez les patientes avec SOPK au deuxième trimestre de la grossesse et au moment de l'accouchement (Königer *et al.*, 2018; Tata *et al.*, 2018; Detti *et al.*, 2019; Piltonen *et al.*, 2019; Valdimarsdottir *et al.*, 2019).

Aucune différence de l'IPA ($=(\text{proAMH}/\text{AMH}_{\text{totale}})*100$) n'a été montrée au cours de la grossesse et entre nos deux groupes, SOPK et témoin, à tous les temps de suivi, comme ceci avait été démontré antérieurement dans une population de femmes témoins (Pankhurst *et al.*, 2016b).

Dans une précédente étude, nous avons montré que le clivage de l'AMH dans le sérum pouvait être influencé par le statut métabolique et, en particulier, par l'IMC (Peigné *et al.*, 2020), avec un clivage plus important de l'AMH dans les populations obèses. Dans notre population, avant la grossesse, nous retrouvons également un IPA plus faible chez les femmes obèses ou en surpoids, cependant ces différences disparaissent pendant la grossesse. En revanche, au cours de la grossesse, les taux d'AMH et d'AMH clivée, sont plus faibles chez les femmes obèses/en surpoids que chez les femmes de poids normal alors qu'ils n'étaient pas différents avant celle-ci. Lorsque l'on regarde au sein de ces deux groupes, femmes obèses/en surpoids ou poids normal, les patientes avec SOPK de poids normal ont toujours des taux d'AMH et d'AMH clivée plus élevés que les patientes témoins alors que dans le groupe obèses/en surpoids, cette différence n'est plus retrouvée au troisième trimestre de la grossesse. Ainsi, en fonction du phénotype métabolique, l'impact possible de l'AMH pendant la grossesse pourrait être différent, peut-être moins important chez les femmes obèses que chez les femmes

de poids normal. Ceci avait déjà été évoqué dans l'étude de Tata *et al.* mais, dans cette étude transversale, nous n'avions pas de données sur les valeurs d'AMH avant la grossesse et donc les groupes n'étaient peut-être pas réellement comparables (Tata *et al.*, 2018).

Dans le modèle murin, l'injection d'AMH en fin de gestation provoque une hyperandrogénie maternelle pouvant agir sur le développement fœtal et participer à l'émergence d'un SOPK, comme cela a été bien montré dans de nombreux modèles animaux (Abbott *et al.*, 2005; Monniaux *et al.*, 2019; Raperport and Homburg, 2019; Stener-Victorin *et al.*, 2020). Dans notre étude, tout comme ce qui est décrit dans la littérature (Sir-Petermann *et al.*, 2002; Maliqueo *et al.*, 2013, 2015; Glintborg *et al.*, 2018; Piltonen *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020), les taux circulants de testostérone totale augmentent significativement au cours de la grossesse dans nos deux populations et sont plus élevés dans la population avec SOPK que dans la population témoin à tous les temps du suivi sauf au troisième trimestre. Ceci est sans doute dû à un manque de puissance au troisième trimestre puisque pour 14 patientes témoins le dosage doit encore être réalisé. Dans notre étude, l'hyperandrogénie maternelle semble donc se confirmer pendant la grossesse des femmes porteuses d'un SOPK mais puisque seule la testostérone libre est réellement active, des dosages complémentaires de la SHBG, pour le calcul de la testostérone libre, et des autres androgènes sont prévus. Ces dosages complémentaires seront également à prendre en considération en fonction du sexe fœtal. En effet, plusieurs auteurs ont retrouvé un impact du sexe fœtal sur le taux circulant des androgènes ou de l'AMH chez la mère, avec des taux d'androgènes et d'AMH plus élevés chez les femmes avec SOPK que chez les témoins uniquement lorsqu'elles portent une fille (Caanen *et al.*, 2016; Piltonen *et al.*, 2019), mais d'autres non (Vanky and Carlsen, 2012; Detti *et al.*, 2019). Dans notre étude, les taux d'AMH restent plus élevés chez les patientes SOPK que chez les témoins quel que soit le sexe fœtal mais cette différence n'est plus significative au troisième trimestre de la grossesse quand la femme porte un garçon. Aucune différence n'est, par contre, notée concernant les taux d'androgènes selon le sexe fœtal entre les femmes avec SOPK et les femmes témoins, probablement par manque de puissance statistique.

L'IMC ne semble pas avoir d'impact sur l'hyperandrogénie maternelle tout comme le phénotype clinique initial du SOPK (A, B, C ou D). Cependant, ceci reste à confirmer avec les nouveaux dosages, surtout de la SHBG qui est fortement abaissée par l'hyperinsulinisme et pourrait masquer une hyperandrogénie gestationnelle par une hausse de la testostérone libre malgré un taux de testostérone totale non différent.

L'hypothèse que l'AMH augmentée puisse être à l'origine de cette hyperandrogénie maternelle chez la mère dans l'espèce humaine est renforcée, dans la littérature, par une corrélation positive entre AMH et androgènes (testostérone totale et androsténone) retrouvée dans le sérum des femmes enceintes au deuxième trimestre de la grossesse et au moment de l'accouchement (Piltonen *et al.*, 2019; Valdimarsdottir *et al.*, 2019). Pour notre part, nous ne retrouvons pas de corrélation au troisième trimestre de la grossesse entre les taux de testostérone et d'AMH et de ses différentes formes moléculaires, mais ceci devra être confirmé ou infirmé une fois les dosages effectués chez toutes les patientes, et les analyses supplémentaires réalisées, en particulier, les dosages de la testostérone libre.

D'après les travaux initiaux dans le modèle pAMH, cette hyperandrogénie pourrait être secondaire à l'action de l'AMH à deux niveaux, soit (1) au niveau central par une hyperactivation des neurones à GnRH maternels, porteurs de l'AMHR2, qui seraient à l'origine d'une hypersécrétion de LH agissant principalement sur l'ovaire pour majorer la sécrétion d'androgènes soit (2) au niveau périphérique par une action sur la stéroïdogénèse placentaire.

Chez la femme, pendant la grossesse, nous avons montré que le taux de LH sérique diminue fortement sous l'effet du rétrocontrôle négatif des œstrogènes produits par le placenta. Il reste plus élevé au premier trimestre de la grossesse chez les patientes avec SOPK, surtout chez les patientes de poids normal mais à un niveau bien moindre qu'avant la grossesse. La LH pourrait donc théoriquement participer à l'hyperandrogénie gestationnelle mais uniquement en tout début de grossesse. Ceci va également dans le sens de la physiologie, puisqu'en fin du premier trimestre de la grossesse, le placenta va prendre le relais de l'ovaire pour devenir l'organe endocrinien majoritaire pour la production des stéroïdes pendant la grossesse. L'hCG, sécrétée par le placenta, va se fixer de façon préférentielle sur le récepteur LH/hCG, rendant l'action de la LH anecdotique une fois que le relai placentaire est en place. Il ne semble donc pas, dans l'espèce humaine, que l'action de l'AMH potentiellement à l'origine de l'hyperandrogénie gestationnelle soit centrale.

L'impact possible de l'AMH sur la stéroïdogénèse placentaire n'est possible que par la présence de son récepteur spécifique, l'AMHR2, sur le trophoblaste. Une seule étude antérieure, en 2015, avait démontré l'expression et la présence de l'AMHR2 sur le trophoblaste humain et sur les membranes fœtales (Novembri *et al.*, 2015). Nous confirmons ici l'expression de l'AMHR2 par le trophoblaste humain, issu de femmes avec SOPK ou de femmes témoins, même s'il est relativement faiblement exprimé par rapport aux gènes des enzymes de la stéroïdogénèse. Des analyses immuno-histo-chimiques et en Western Blot devront être réalisées

pour confirmer la présence de la protéine « AMHR2 » sur le trophoblaste humain. En revanche, contrairement à ce qui avait été démontré par Novembri *et al.*, nous ne retrouvons pas d'expression de l'AMH sur nos premières QPCR. Des contrôles devront être effectués dans d'autres conditions expérimentales pour confirmer ou infirmer ce résultat.

Nos analyses d'expression des gènes des enzymes de la stéroïdogénèse sont, pour le moment, parcellaires mais elles ne montrent, à ce jour, pas de différences significatives entre les placentas de femmes avec SOPK et ceux des femmes témoins. Dans la littérature, l'expression de la CYP11A1 était la seule modifiée, et diminuée, dans le placenta humain de femmes avec SOPK versus témoins parmi tous les gènes des enzymes de la stéroïdogénèse testés (Maliqueo *et al.*, 2015). Chez la souris, dans notre modèle pAMH, les expressions de la CYP 19A1 et de la 3B HSD1 étaient diminuées dans le placenta des souris exposées à l'AMH alors que celle de la CYP11A1 n'était pas modifiée (Tata *et al.*, 2018). En plus de cette analyse d'expression, une analyse de l'activité de ces gènes serait intéressante à réaliser puisque les résultats de la littérature montrent des résultats discordants entre l'expression et l'activité de certains gènes de la stéroïdogénèse placentaire. En effet, une autre étude de Maliqueo *et al.* a mis en évidence que, malgré l'absence de modification d'expression des gènes de la CYP 19A1 et de la 3B HSD1 dans le placenta de femmes avec SOPK versus femmes témoins (Maliqueo *et al.*, 2015), leur activité était modifiée : diminuée pour la CYP 19A1 et augmentée pour la 3B HSD1 (Maliqueo *et al.*, 2013). Par ailleurs, des différences entre les expressions géniques et les sécrétions de stéroïdes de l'unité fœto-placentaire ont également été montrées en fonction du sexe fœtal (Osei-Kumah *et al.*, 2011, 2011; Yeganegi *et al.*, 2011; Saif *et al.*, 2014). Cela devra être analysé dans notre population.

Une autre approche pour étudier l'activité de la stéroïdogénèse placentaire chez les femmes avec SOPK est la recherche de corrélations entre l'expression placentaire des différents gènes des enzymes de la stéroïdogénèse et le taux circulant de chacun des androgènes (SDHEA, androsténone, testostérone libre et totale) individuellement chez chaque femme. En effet, nous avons dans cette étude longitudinale la possibilité de faire le lien, pour chaque femme avec SOPK ou témoin, entre les stéroïdes pendant la grossesse et l'expression placentaire des différentes enzymes de la stéroïdogénèse.

Par ailleurs, puisque des travaux récents de notre équipe ont mis en évidence des modifications épigénétiques transmissibles, secondaires à l'exposition *in utero* de souris à la première génération à de l'AMH, dont certaines étaient retrouvées dans l'espèce humaine (Mimouni *et al.*, 2021), nous envisageons de mesurer l'expression de certains gènes présentant

des modifications épigénétiques dans l'étude de Mimouni *et al.*. Plus largement, une étude extensive de l'expression des gènes placentaires ou des marques épigénétiques entre SOPK et témoins est envisagée.

Le lien entre l'AMH et les modifications de la stéroïdogénèse placentaire pourra également être affiné par la mesure des corrélations entre les taux d'AMH, et de ses différentes formes moléculaires, les stéroïdes circulants et l'expression des gènes des enzymes de la stéroïdogénèse individuellement chez chaque femme. Toutes ces données pourront être étudiées en fonction du phénotype du SOPK (A, B, C ou D) et en fonction de l'IMC. Les analyses des cultures trophoblastiques réalisées en présence d'AMH à différentes concentrations chez des femmes SOPK et témoin seront même un élément encore plus concluant du lien entre AMH et régulation de la stéroïdogénèse.

Malheureusement, nous ne disposons pas de sang de cordon qui nous aurait permis de faire des liens également avec les taux circulants d'androgènes ou d'AMH chez le fœtus. Cependant, les taux circulants des stéroïdes chez l'enfant à la naissance ne sont pas forcément très représentatifs de ce qui se passe *in utero*, le mieux étant de disposer d'échantillons de liquide amniotique (van de Beek *et al.*, 2004). En effet, à la naissance, l'axe gonadotrope est au repos alors qu'il est actif *in utero* en milieu de gestation. Il reprendra une activité transitoire quelques jours plus tard pour quelques mois pendant la période de « mini-puberté ». Ainsi, dans l'étude de van de Beek *et al.*, aucune corrélation n'est retrouvée entre les taux d'androgènes mesurés dans le liquide amniotique au deuxième trimestre de la grossesse et les taux d'androgènes dans le sang de cordon à la naissance (van de Beek *et al.*, 2004). Dans la littérature, les résultats sont conflictuels quant au lien entre taux circulants d'androgènes chez l'enfant à la naissance et chez la mère atteinte d'un SOPK : plus élevés, identiques ou plus faibles (Hickey *et al.*, 2009; Barry *et al.*, 2010; Mehrabian and Kelishadi, 2012; Maliqueo *et al.*, 2013; Caanen *et al.*, 2016; Daan *et al.*, 2017; Detti *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020). (Hickey *et al.*, 2009; Maliqueo *et al.*, 2013; Caanen *et al.*, 2016; Detti *et al.*, 2019). En tout cas, la seule étude ayant mesuré la testostérone dans le liquide amniotique de filles de femmes avec SOPK a montré que celui-ci était augmenté par rapport aux femmes témoins (Palomba *et al.*, 2012).

De même, les taux d'AMH dans le sang de cordon de filles ou de garçons de femmes avec SOPK sont parfois retrouvés plus élevés ou non que ceux chez les femmes témoins (Sir-Petermann *et al.*, 2006; Crisosto *et al.*, 2012; Detti *et al.*, 2019; Tadaion Far *et al.*, 2019) ou parfois non différents (Caanen *et al.*, 2016; Kollmann *et al.*, 2019). Cependant une méta-analyse réalisée très récemment sur le sujet va dans le sens d'une augmentation des taux d'AMH

circulant chez le nouveau-né d'une femme avec SOPK versus celui d'une femme témoin, uniquement chez les fœtus du sexe féminin (Zhou *et al.*, 2021). Par la suite, les taux d'AMH chez les filles de femmes avec SOPK sont significativement plus élevés de 2 à 3 fois que chez les filles de femmes témoins, et ce depuis la petite enfance (2-3 mois) (Sir-Petermann *et al.*, 2006) jusqu'aux périodes pré ou péri-pubertaires (Sir-Petermann *et al.*, 2006; Crisosto *et al.*, 2007, 2019; Torchen *et al.*, 2019).

Plus que le sang de cordon, le plus intéressant pour avancer réellement dans la compréhension de l'héritabilité du syndrome serait de pouvoir étudier les filles de nos patientes après la puberté et pouvoir leur proposer des analyses hormonales, génétiques et épigénétiques.

Notre étude présente plusieurs limites. Nous ne disposons pas d'informations sur les pathologies de la grossesse et en particulier sur l'incidence du diabète gestationnel qui pourrait, par l'hyperinsulinisme qu'il peut provoquer, participer à l'état d'hyperandrogénie maternel, cependant, au premier trimestre de la grossesse, la glycémie à jeun n'était pas différente entre nos deux groupes. De plus, notre population contrôle est une population de femmes infertiles qui n'ont pas de problème ovarien mais qui ont subi, pour la majorité d'entre elles, des traitements d'AMP pour obtenir la grossesse. Du fait de l'influence connue de ces traitements sur les pathologies obstétricales ultérieures, et donc de l'impact possible sur la placentation, nous ne pouvons écarter ce biais pour l'analyse des données placentaires. Enfin, concernant également les analyses placentaires, celles-ci doivent toujours être interprétées avec précaution surtout en fonction du contexte de l'accouchement et du traitement initial des échantillons. Certains auteurs indiquent que l'accouchement par voie basse ou la péridurale par exemple peuvent impacter les analyses placentaires (Burton *et al.*, 2014). Dans notre étude, puisque nous faisons un suivi longitudinal des patientes, nous ne pouvions sélectionner à l'avance la voie d'accouchement ou demander aux femmes d'accoucher sans péridurale. Cependant, nous n'observons pas de différence sur la voie d'accouchement entre nos deux groupes. Les biopsies ont été effectuées rapidement en s'assurant de la bonne conservation à 4°C du placenta dans l'intervalle et nous avons récupéré au moins trois cotylédons par placenta, analysés séparément pour limiter les biais.

L'hyperandrogénie pendant la grossesse semble donc être à l'origine de cette reprogrammation fœtale favorisant l'apparition d'un SOPK ultérieur. Celle-ci pourrait avoir une origine différente selon le profil métabolique des patientes. Chez les patientes minces avec SOPK, l'AMH et surtout sa forme clivée, pourraient favoriser cette hyperandrogénie, peut-être, au premier trimestre par une action de la LH sur l'ovaire, mais surtout par des modifications de

la stéroïdogénèse placentaire. Chez les patientes obèses avec SOPK, cette même hyperandrogénie pendant la grossesse, secondaire à une hyperactivation de l'ovaire puis une modification de la stéroïdogénèse placentaire, pourrait être favorisée par l'hyperinsulinisme. En effet, l'insuline est connue pour inhiber l'activité de l'aromatase dans le trophoblaste humain et stimuler l'activité de la 3B HSD1 (Nestler, 1989, 1993). Ainsi, comme dans la physiopathologie du SOPK, qui donne une place différente à l'AMH et à l'insuline selon les profils métaboliques, l'héritabilité du SOPK pourrait suivre le même chemin.

Pour conclure, nous avons pu montrer, dans cette première étude de suivi longitudinal pendant toute la grossesse de femmes avec SOPK et de femmes témoins, que l'AMH et, en particulier l'AMH clivée-bioactive, restait plus élevée chez les femmes avec SOPK tout au long de la grossesse. Elle pourrait être un élément déterminant à l'origine d'une modification de l'environnement *in utero* qui puisse favoriser la transmission du syndrome. L'impact de l'AMH pourrait être différent selon le phénotype clinique ou métabolique des patientes et nécessite d'être exploré plus avant.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au total, au cours de ce travail de thèse, nous avons exploré les liens entre AMH et SOPK à différents niveaux. Nous avons mis en évidence que la proportion des formes moléculaires de l'AMH dans le sérum variait selon le statut métabolique des patientes avec une proportion plus élevée de formes clivées, *a priori* actives, de l'AMH dans le sérum des patientes obèses par rapport aux patientes minces. Cette variation n'était pas retrouvée au niveau folliculaire, ce qui laisse à penser que l'impact de l'obésité sur le clivage de l'AMH a lieu en extra-ovarien. La proportion de formes clivées n'était pas différente, en soi, entre femmes avec SOPK et femmes témoins mais, puisque le taux d'AMH totale est plus élevé dans le sérum et dans le liquide folliculaire de femmes avec SOPK, les taux d'AMH clivés dans le sérum et dans le liquide folliculaire sont également plus importants. Ainsi, l'AMH pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie du SOPK en agissant sur ses tissus cibles à différents niveaux. Au niveau de l'ovaire, l'AMH pourrait avoir une action auto-ou paracrine directe peu influencée par le statut métabolique. Au niveau du reste des organes cibles, l'impact de l'AMH pourrait être modulé par son clivage, augmenté chez les patientes obèses. Ainsi, l'AMH, par la modulation de ses formes actives circulantes en fonction de l'environnement métabolique, pourrait avoir des impacts différents selon les phénotypes métaboliques des patientes.

Pendant la grossesse, nous avons montré que les taux d'AMH, et de sa forme clivée, bien que décroissants tout au long de la grossesse, restaient plus élevés chez les patientes avec SOPK que chez les témoins à tous les temps du suivi, sans aucune modification de la proportion relative dans le sérum de ses formes moléculaires. A ces taux plus élevés d'AMH s'associaient des taux plus élevés de testostérone chez les femmes avec SOPK que chez les femmes témoins. Comme dans la première partie de notre travail, l'IMC semblerait avoir également un impact pendant la grossesse, avec des taux d'AMH et d'AMH clivés qui sont plus faibles chez les patientes obèses. De plus, au sein du groupe obèse/en surpoids, au troisième trimestre de la grossesse, les taux d'AMH ne sont plus différents entre femmes avec SOPK et témoins. Ainsi, en fonction du phénotype métabolique, l'impact possible de l'AMH pendant la grossesse pourrait être différent, peut-être moins important chez les femmes obèses que chez les femmes de poids normal.

Au cours de la grossesse, l'impact de l'AMH pourrait varier, sur des organes cibles successivement différents. Au début de ce travail de thèse, il avait été émis l'hypothèse, suite aux expériences sur le modèle murin pAMH (Tata *et al.*, 2018), que l'AMH pouvait favoriser un environnement d'hyperandrogénie *in utero* possiblement à l'origine de modifications d'expressions géniques ou épigénétiques pendant le développement fœtal. Ces modifications pourraient prédisposer au développement ultérieur d'un SOPK à l'âge adulte soit (1) par une

action centrale positive sur le neurone à GnRH, conduisant à une augmentation des taux sériques de LH pouvant stimuler une hyperandrogénie ovarienne, soit (2) par une action périphérique sur le placenta en modulant la stéroïdogénèse ovarienne, en particulier l'aromatase, pour favoriser un état d'hyperandrogénie placentaire.

Dans ce travail, nous avons également montré que les taux de LH étaient très bas en cours de grossesse et indosables chez près de la moitié des patientes, SOPK ou témoin, en fin de grossesse. Un taux plus élevé de LH chez les femmes avec SOPK est retrouvé uniquement au premier trimestre de la grossesse et uniquement chez les patientes de poids normal ; la LH ne pourrait donc jouer un rôle dans l'hyperandrogénie ovarienne qu'à ces conditions.

L'action de l'AMH pour favoriser l'hyperandrogénie serait donc plutôt placentaire. Nos résultats parcellaires de l'étude de l'expression des gènes placentaires des enzymes la stéroïdogénèse ne nous permettent pas de conclure ; cependant, dans la littérature, des modifications d'activité ou d'expression génique ou protéiques ont été rapportées dans les placentas de femmes avec SOPK versus ceux de femmes témoins (Maliqueo *et al.*, 2013, 2015; Sun *et al.*, 2020).

Par ailleurs, il est bien décrit dans la littérature que l'insuline joue aussi un rôle sur le placenta en modifiant également la stéroïdogénèse placentaire et en favorisant un état d'hyperandrogénie gestationnelle (Barbieri *et al.*, 1986; Nestler, 1989, 1993). Ainsi, chez certaines patientes avec SOPK en surpoids, obèses, présentant un diabète gestationnel ou un hyperinsulinisme, l'action de l'insuline sur le placenta pourrait se conjuguer à l'action de l'AMH. Enfin, l'AMH peut agir également sur le pancréas, qui possède l'AMHR2 au niveau des îlots de Langerhans, peut-être en favorisant cet hyperinsulinisme (Segerstolpe *et al.*, 2016).

Nous proposons donc l'hypothèse physiopathologique suivante de l'impact de l'AMH chez les patientes avec SOPK en fonction de l'IMC et du terme de la grossesse pour l'héritabilité du syndrome (**Figure**).

FEMMES AVEC SOPK

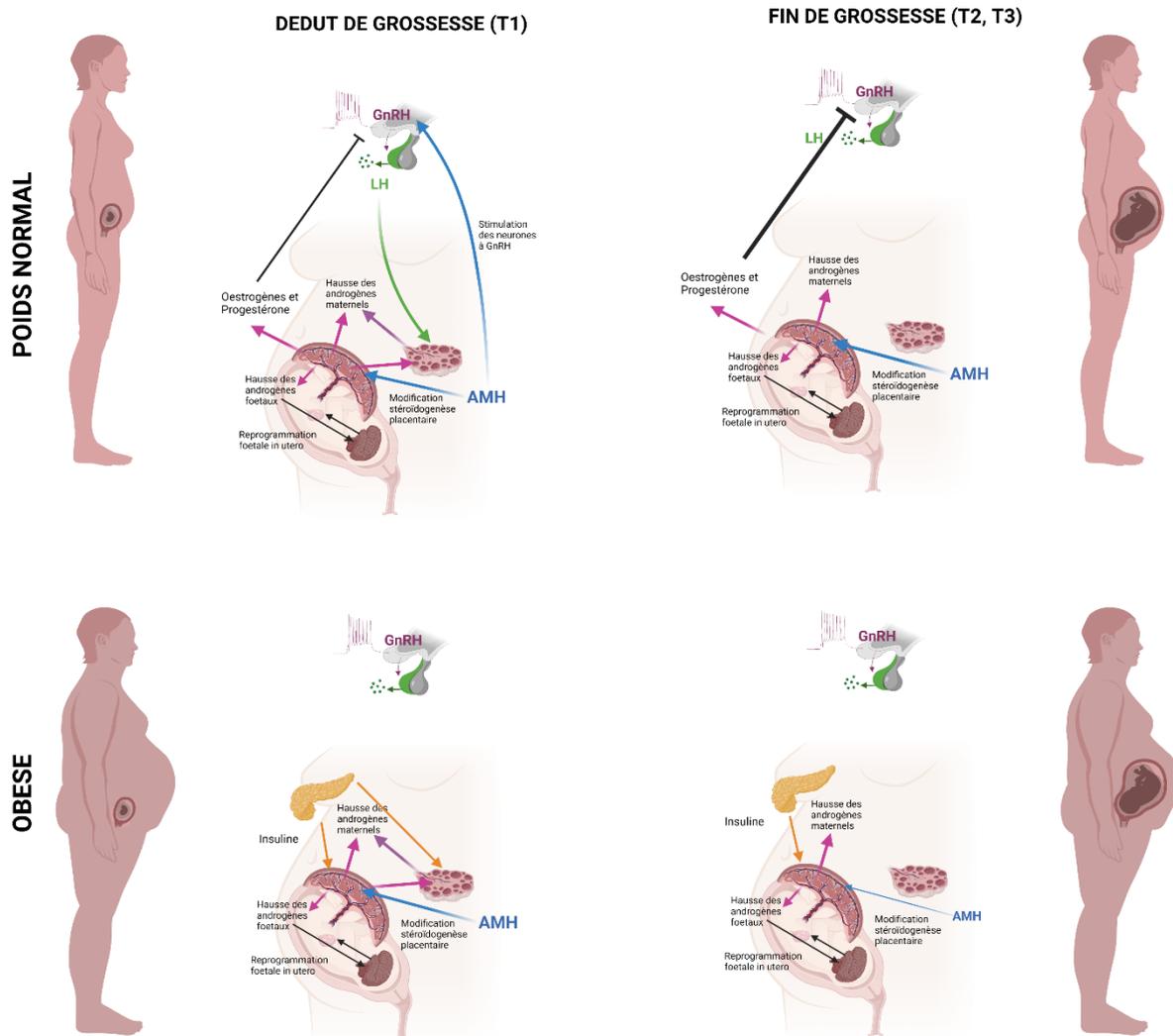


Figure : Hypothèse physiopathologique de l'impact de l'AMH et de l'insuline chez les patientes avec SOPK en fonction de l'IMC et du terme de la grossesse sur l'hyperandrogénie gestationnelle et la reprogrammation fœtale in utero. Chez la femme avec SOPK de poids normal, en début de grossesse (T1) le taux d'AMH reste élevé et peut agir (flèches bleues), entre autres, au niveau central sur les neurones à GnRH et au niveau périphérique, sur le placenta. L'effet central va favoriser le maintien d'un taux de LH non nul qui va pouvoir avoir un effet ovarien pour la fabrication des androgènes (flèche verte). Le placenta va ensuite progressivement prendre le relai de l'ovaire pour la stéroïdogénèse : synthèse d'androgènes, œstrogènes et progestérone (flèches roses). Par la sécrétion d'hCG il pourra soutenir initialement la stéroïdogénèse ovarienne jusqu'au relai placentaire et par la synthèse d'œstrogènes et de progestérone, il va exercer un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamo-hypophyse (flèche noire). En fin de grossesse (T2, T3), l'AMH peut favoriser l'hyperandrogénie gestationnelle par son action sur la stéroïdogénèse placentaire. Chez la femme obèse avec SOPK, l'AMH semble avoir une action surtout en début de grossesse. L'insuline, produite par le pancréas, pourrait participer à l'hyperandrogénie gestationnelle, par son action placentaire, pendant toute la grossesse (flèche orange). L'état d'hyperandrogénie in utero pourra ensuite conduire à la reprogrammation fœtale in utero, en particulier des neurones à GnRH qui à leur tour pourront impacter la programmation ovarienne fœtale. T1, T2, T3 : premier, deuxième et troisième trimestres de la grossesse ; AMH : hormone anti-müllérienne ; SOPK : syndrome des ovaires polykystiques

Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse et avancer dans la recherche sur les liens entre AMH et SOPK pendant la grossesse dans l'espèce humaine, de nombreux travaux peuvent être menés. Tout d'abord sur notre cohorte actuelle, il sera nécessaire de terminer le suivi des dernières femmes incluses, de réaliser les dosages complémentaires des autres androgènes, et en particulier de la testostérone libre puisque c'est la seule réellement active, et de compléter les analyses d'expressions géniques et protéiques placentaires prévues. Toutes ces analyses seront à prendre en considération en fonction du sexe fœtal, mais également en fonction de l'IMC et du phénotype clinique initial du SOPK (A, B, C ou D). Des corrélations devront être recherchées, au niveau individuel puisque cela est possible dans notre étude, même si elles ne sont pas la preuve d'un lien de cause à effet. En plus de l'IMC et du poids pendant la grossesse, des mesures et des données complémentaires sur l'environnement métabolique pendant la grossesse devront être recueillies (insulinémie, diabète gestationnel, etc.).

Puis, plus largement, une étude extensive de l'expression des gènes placentaires ou des marques épigénétiques entre SOPK et témoins doit être envisagée pour permettre de chercher d'autres pistes de l'impact possible de l'AMH sur le placenta. Les analyses des cultures trophoblastiques réalisées en présence d'AMH à différentes concentrations chez des femmes SOPK et témoin permettront d'affiner encore plus l'impact de l'AMH sur le placenta dans l'espèce humaine.

Pour explorer l'effet de l'AMH sur le pancréas humain, pendant la grossesse mais également en dehors de la grossesse, des cultures d'îlots de Langherans humains en présence d'AMH à différentes concentrations pourraient permettre, par mesure de l'excrétion d'insuline dans le milieu de culture, de connaître l'impact de l'AMH sur cet organe.

Par ailleurs, pour avoir des données encore plus intéressantes et objectives sur l'impact de l'environnement *in utero*, sur l'héritabilité du SOPK, il serait nécessaire de pouvoir étudier les enfants, et en particulier les filles, de nos patientes suivies dans cette cohorte, après la puberté et pouvoir leur proposer des analyses hormonales, génétiques et épigénétiques.

Enfin, même si je n'ai pas personnellement travaillé sur les modèles animaux pendant ma thèse, la poursuite de l'expérimentation animale est indispensable pour pouvoir affiner nos hypothèses et les tester ensuite dans l'espèce humaine, comme cela est le cas dans l'équipe où je travaille avec les différents travaux cités dans ce manuscrit (Cimino *et al.*, 2016; Tata *et al.*, 2018; Malone *et al.*, 2019; Mimouni *et al.*, 2021). Par exemple, des études précliniques chez les souris obèses seraient nécessaires pour savoir si, comme chez l'Homme, les formes moléculaires circulantes de l'AMH sont modifiées par l'obésité et quels pourraient être les

enzymes et les mécanismes à l'origine des modifications de clivage dans le sérum. Pour finir, puisque l'AMH et l'AMHR2 sont exprimés dans de très nombreux organes ("The human protein atlas," n.d.), le champ de recherche reste large pour explorer, par des modèles animaux pré-cliniques pour commencer, le rôle de l'AMH en physiologie et en pathologie.

REFERENCES

- Abbara A, Eng PC, Phylactou M, Clarke SA, Hunjan T, Roberts R, Vimalasvaran S, Christopoulos G, Islam R, Purugganan K, *et al.* Anti-Müllerian hormone (AMH) in the Diagnosis of Menstrual Disturbance Due to Polycystic Ovarian Syndrome. *Front Endocrinol* [Internet] 2019;**10**..
- Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update* 2005;**11**:357–374.
- Abbott DH, Rayome BH, Dumesic DA, Lewis KC, Edwards AK, Wallen K, Wilson ME, Appt SE, Levine JE. Clustering of PCOS-like traits in naturally hyperandrogenic female rhesus monkeys. *Hum Reprod Oxf Engl* 2017;**32**:923–936.
- Al-Asaad I, Chardard D, Clemente N di, Picard J-Y, Dumond H, Chesnel A, Flament S. Müllerian inhibiting substance in the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*. *Endocrinology* 2013;**154**:3931–3936.
- Alebic MŠ, Stojanovic N, Dewailly D. Discordance between serum anti-Müllerian hormone concentrations and antral follicle counts: not only technical issues. *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;**33**:1141–1148.
- Alvaggi C, Andersen CY, Buehler K, Conforti A, Placido GD, Esteves SC, Fischer R, Galliano D, Polyzos NP, Sunkara SK, *et al.* A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept. *Fertil Steril* 2016;**105**:1452–1453.
- Andersen CY, Byskov AG. Estradiol and regulation of anti-Müllerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:4064–4069.
- Arango NA, Kobayashi A, Wang Y, Jamin SP, Lee H-H, Orvis GD, Behringer RR. A mesenchymal perspective of Müllerian duct differentiation and regression in *Amhr2-lacZ* mice. *Mol Reprod Dev* 2008;**75**:1154–1162.
- Arce J-C, La Marca A, Mirner Klein B, Nyboe Andersen A, Fleming R. Antimüllerian hormone in gonadotropin releasing-hormone antagonist cycles: prediction of ovarian response and cumulative treatment outcome in good-prognosis patients. *Fertil Steril* 2013;**99**:1644–1653.
- Azziz R. PCOS in 2015: New insights into the genetics of polycystic ovary syndrome. *Nat Rev Endocrinol* 2016;**12**:74–75.
- Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, Leeuwen EC van, Themmen AP, Grootegoed JA. Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 1995;**136**:4951–4962.

- Baba T, Ting AY, Tkachenko O, Xu J, Stouffer RL. Direct actions of androgen, estrogen and anti-Müllerian hormone on primate secondary follicle development in the absence of FSH in vitro. *Hum Reprod Oxf Engl* 2017;**32**:2456–2464.
- Barbie TU, Barbie DA, MacLaughlin DT, Maheswaran S, Donahoe PK. Mullerian Inhibiting Substance inhibits cervical cancer cell growth via a pathway involving p130 and p107. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:15601–15606.
- Barbieri RL, Saltzman DH, Torday JS, Randall RW, Frigoletto FD, Ryan KJ. Elevated concentrations of the beta-subunit of human chorionic gonadotropin and testosterone in the amniotic fluid of gestations of diabetic mothers. *Am J Obstet Gynecol* 1986;**154**:1039–1043.
- Barbotin A-L, Peigné M, Malone SA, Giacobini P. Emerging Roles of Anti-Müllerian Hormone in Hypothalamic-Pituitary Function. *Neuroendocrinology* 2019;**109**:218–229.
- Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007;**261**:412–417.
- Barrett ES, Hoeger KM, Sathyanarayana S, Abbott DH, Redmon JB, Nguyen RHN, Swan SH. Anogenital distance in newborn daughters of women with polycystic ovary syndrome indicates fetal testosterone exposure. *J Dev Orig Health Dis* 2018;**9**:307–314.
- Barry JA, Azizia MM, Hardiman PJ. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2014;**20**:748–758.
- Barry JA, Kay AR, Navaratnarajah R, Iqbal S, Bamfo JE a. K, David AL, Hines M, Hardiman PJ. Umbilical vein testosterone in female infants born to mothers with polycystic ovary syndrome is elevated to male levels. *J Obstet Gynaecol J Inst Obstet Gynaecol* 2010;**30**:444–446.
- Bédécarrats GY, O’Neill FH, Norwitz ER, Kaiser UB, Teixeira J. Regulation of gonadotropin gene expression by Mullerian inhibiting substance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:9348–9353.
- Beek C van de, Thijssen JHH, Cohen-Kettenis PT, Goozen SHM van, Buitelaar JK. Relationships between sex hormones assessed in amniotic fluid, and maternal and umbilical cord serum: what is the best source of information to investigate the effects of fetal hormonal exposure? *Horm Behav* 2004;**46**:663–669.
- Bellver J, Rodríguez-Tabernero L, Robles A, Muñoz E, Martínez F, Landeras J, García-Velasco J, Fontes J, Álvarez M, Álvarez C, *et al.* Polycystic ovary syndrome throughout a woman’s life. *J Assist Reprod Genet* 2018;**35**:25–39.
- Bézar J, Vigier B, Tran D, Mauléon P, Josso N. Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. *J Reprod Fertil* 1987;**80**:509–516.
- Bhide P, Dilgil M, Gudi A, Shah A, Akwaa C, Homburg R. Each small antral follicle in ovaries of women with polycystic ovary syndrome produces more antimüllerian hormone than its counterpart in a normal ovary: an observational cross-sectional study. *Fertil Steril* 2015;**103**:537–541.

- Birch Petersen K, Hvidman HW, Forman JL, Pinborg A, Larsen EC, Macklon KT, Sylvest R, Andersen AN. Ovarian reserve assessment in users of oral contraception seeking fertility advice on their reproductive lifespan. *Hum Reprod Oxf Engl* 2015;**30**:2364–2375.
- Bourgneuf C, Bailbé D, Lamazière A, Dupont C, Moldes M, Farabos D, Roblot N, Gauthier C, Mathieu d'Argent E, Cohen-Tannoudji J, *et al.* The Goto-Kakizaki rat is a spontaneous prototypical rodent model of polycystic ovary syndrome. *Nat Commun* 2021;**12**:1064.
- Brodin T, Hadziosmanovic N, Berglund L, Olovsson M, Holte J. Antimüllerian hormone levels are strongly associated with live-birth rates after assisted reproduction. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;**98**:1107–1114.
- Broer SL, Disseldorp J van, Broeze KA, Dolleman M, Opmeer BC, Bossuyt P, Eijkemans MJC, Mol BWJ, Broekmans FJM, Group on behalf of the I study, *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. *Hum Reprod Update* 2013a;**19**:26–36. Oxford Academic.
- Broer SL, Dólleman M, Disseldorp J van, Broeze KA, Opmeer BC, Bossuyt PMM, Eijkemans MJC, Mol BW, Broekmans FJM, IPD-EXPORT Study Group. Prediction of an excessive response in in vitro fertilization from patient characteristics and ovarian reserve tests and comparison in subgroups: an individual patient data meta-analysis. *Fertil Steril* 2013b;**100**:420-429.e7.
- Bruyneel A, Catteau-Jonard S, Decanter C, Clouqueur E, Tomaszewski C, Subtil D, Dewailly D, Robin G. Syndrome des ovaires polymicrokystiques : une pathologie à risque obstétrical ? *Gynécologie Obstétrique Fertil* 2014;**42**:104–111.
- Burton GJ, Sebire NJ, Myatt L, Tannetta D, Wang Y-L, Sadovsky Y, Staff AC, Redman CW. Optimising sample collection for placental research. *Placenta* 2014;**35**:9–22.
- Caanen MR, Kuijper EA, Hompes PG, Kushnir MM, Rockwood AL, Meikle WA, Homburg R, Lambalk CB. Mass spectrometry methods measured androgen and estrogen concentrations during pregnancy and in newborns of mothers with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2016;**174**:25–32.
- Cain BM, Connolly K, Blum A, Vishnuvardhan D, Marchand JE, Beinfeld MC, Vishnuvardham D. Distribution and colocalization of cholecystokinin with the prohormone convertase enzymes PC1, PC2, and PC5 in rat brain. *J Comp Neurol* 2003;**467**:307–325.
- Campbell BK, Clinton M, Webb R. The Role of Anti-Müllerian Hormone (AMH) During Follicle Development in a Monoovulatory Species (Sheep). *Endocrinology* 2012;**153**:4533–4543.
- Cappy H, Pigny P, Leroy-Billiard M, Dewailly D, Catteau-Jonard S. Falsely elevated serum antimüllerian hormone level in a context of heterophilic interference. *Fertil Steril* 2013;**99**:1729–1732.
- Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen APN, Hovatta O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod Oxf Engl* 2006;**21**:2223–2227.

- Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 1986;**45**:685–698.
- Catteau-Jonard S, Bancquart J, Poncelet E, Lefebvre-Maunoury C, Robin G, Dewailly D. Polycystic ovaries at ultrasound: normal variant or silent polycystic ovary syndrome? *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012;**40**:223–229.
- Catteau-Jonard S, Jamin SP, Leclerc A, Gonzalès J, Dewailly D, Clemente N di. Anti-Müllerian hormone, its receptor, FSH receptor, and androgen receptor genes are overexpressed by granulosa cells from stimulated follicles in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**:4456–4461.
- Chang H-M, Klausen C, Leung PCK. Antimüllerian hormone inhibits follicle-stimulating hormone-induced adenylyl cyclase activation, aromatase expression, and estradiol production in human granulosa-lutein cells. *Fertil Steril* 2013;**100**:585-592.e1.
- Chauvin M, Garambois V, Colombo P-E, Chentouf M, Gros L, Brouillet J-P, Robert B, Jarlier M, Dumas K, Martineau P, *et al.* Anti-Müllerian hormone (AMH) autocrine signaling promotes survival and proliferation of ovarian cancer cells. *Sci Rep* 2021;**11**:2231.
- Cheon KY, Chung YJ, Cho HH, Kim MR, Cha JH, Kang CS, Lee JY, Kim JH. Expression of Müllerian-Inhibiting Substance/Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor in the Human Theca Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;**103**:3376–3385.
- Chhabra S, McCartney CR, Yoo RY, Eagleson CA, Chang RJ, Marshall JC. Progesterone inhibition of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator: evidence for varied effects in hyperandrogenemic adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**:2810–2815.
- Cimino I, Casoni F, Liu X, Messina A, Parkash J, Jamin SP, Catteau-Jonard S, Collier F, Baroncini M, Dewailly D, *et al.* Novel role for anti-Müllerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. *Nat Commun* 2016;**7**:10055.
- Clemente N di, Jamin SP, Lugovskoy A, Carmillo P, Ehrenfels C, Picard J-Y, Whitty A, Josso N, Pepinsky RB, Cate RL. Processing of anti-müllerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-beta. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2010;**24**:2193–2206.
- Clemente N di, Racine C, Pierre A, Taieb J. Anti-Müllerian hormone in female reproduction. *Endocr Rev* 2021;bnab012.
- Clemente N di, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, Picard JY, Vigier B, Josso N, Cate R. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. *Mol Endocrinol Baltim Md* 1994;**8**:1006–1020.
- Clifton VL. Review: Sex and the human placenta: mediating differential strategies of fetal growth and survival. *Placenta* 2010;**31 Suppl**:S33-39.
- Cohen J. A power primer. *Psychol Bull* 1992;**112**:155–159.

- Cook CL, Siow Y, Brenner AG, Fallat ME. Relationship between serum müllerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril* 2002;**77**:141–146.
- Cooney LG, Dokras A. Beyond fertility: polycystic ovary syndrome and long-term health. *Fertil Steril* 2018;**110**:794–809.
- Cooney LG, Lee I, Sammel MD, Dokras A. High prevalence of moderate and severe depressive and anxiety symptoms in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Oxf Engl* 2017;**32**:1075–1091.
- Crisosto N, Codner E, Maliqueo M, Echiburú B, Sánchez F, Cassorla F, Sir-Petermann T. Anti-Müllerian hormone levels in peripubertal daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**:2739–2743.
- Crisosto N, Echiburú B, Maliqueo M, Pérez V, Ladrón de Guevara A, Preisler J, Sánchez F, Sir-Petermann T. Improvement of hyperandrogenism and hyperinsulinemia during pregnancy in women with polycystic ovary syndrome: possible effect in the ovarian follicular mass of their daughters. *Fertil Steril* 2012;**97**:218–224.
- Crisosto N, Ladrón de Guevara A, Echiburú B, Maliqueo M, Cavada G, Codner E, Paez F, Sir-Petermann T. Higher luteinizing hormone levels associated with antimüllerian hormone in postmenarchal daughters of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2019;**111**:381–388.
- Crosignani PG, Nicolosi AE. Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity. *Hum Reprod Update* 2001;**7**:3–7.
- Daan NMP, Koster MPH, Steegers-Theunissen RP, Eijkemans MJC, Fauser BCJM. Endocrine and cardiometabolic cord blood characteristics of offspring born to mothers with and without polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2017;**107**:261-268.e3.
- Das M, Djahanbakhch O, Hacıhanefioglu B, Saridogan E, Ikram M, Ghali L, Raveendran M, Storey A. Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**:881–887.
- Decanter C, Morschhauser F, Pigny P, Lefebvre C, Gallo C, Dewailly D. Anti-Müllerian hormone follow-up in young women treated by chemotherapy for lymphoma: preliminary results. *Reprod Biomed Online* 2010;**20**:280–285.
- Decanter C, Peigne M, Mailliez A, Morschhauser F, Dassonneville A, Dewailly D, Pigny P. Toward a better follow-up of ovarian recovery in young women after chemotherapy with a hypersensitive antimüllerian hormone assay. *Fertil Steril* 2014;**102**:483–487.
- Deligeoroglou E, Kouskouti C, Christopoulos P. The role of genes in the polycystic ovary syndrome: predisposition and mechanisms. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol* 2009;**25**:603–609.

- Desforges-Bullet V, Gallo C, Lefebvre C, Pigny P, Dewailly D, Catteau-Jonard S. Increased anti-Müllerian hormone and decreased FSH levels in follicular fluid obtained in women with polycystic ovaries at the time of follicle puncture for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2010;**94**:198–204.
- Deti L, Christiansen ME, Francillon L, Ikuwezunma G, Diamond MP, Mari G, Tobiasz AM. Serum Anti-Müllerian hormone (AMH) in mothers with polycystic ovary syndrome (PCOS) and their term fetuses. *Syst Biol Reprod Med* 2019;**65**:147–154.
- Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, Griesinger G, Kelsey TW, La Marca A, Lambalk C, *et al*. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum Reprod Update* 2014a;**20**:370–385.
- Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, Griesinger G, Kelsey TW, La Marca A, Lambalk C, *et al*. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum Reprod Update* 2014b;.
- Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, Duhamel A, Catteau-Jonard S. Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod Oxf Engl* 2011;**26**:3123–3129.
- Dezellus A, Barriere P, Campone M, Lemanski C, Vanlemmens L, Mignot L, Delozier T, Levy C, Bendavid C, Debled M, *et al*. Prospective evaluation of serum anti-Müllerian hormone dynamics in 250 women of reproductive age treated with chemotherapy for breast cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2017;**79**:72–80.
- Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev* 2012;**33**:981–1030.
- Dilaver N, Pellatt L, Jameson E, Ogunjimi M, Bano G, Homburg R, D Mason H, Rice S. The regulation and signalling of anti-Müllerian hormone in human granulosa cells: relevance to polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Oxf Engl* 2019;**34**:2467–2479.
- Dumesic DA, Hoyos LR, Chazenbalk GD, Naik R, Padmanabhan V, Abbott DH. Mechanisms of intergenerational transmission of polycystic ovary syndrome. *Reprod Camb Engl* 2020;**159**:R1–R13.
- Dumesic DA, Lesnick TG, Stassart JP, Ball GD, Wong A, Abbott DH. Intrafollicular antimüllerian hormone levels predict follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone (FSH) in normoandrogenic ovulatory women undergoing gonadotropin releasing-hormone analog/recombinant human FSH therapy for in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 2009;**92**:217–221.
- Dumesic DA, Oberfield SE, Stener-Victorin E, Marshall JC, Laven JS, Legro RS. Scientific Statement on the Diagnostic Criteria, Epidemiology, Pathophysiology, and Molecular Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev* 2015;**36**:487–525.

- Dumont A, Robin G, Catteau-Jonard S, Dewailly D. Role of Anti-Müllerian Hormone in pathophysiology, diagnosis and treatment of Polycystic Ovary Syndrome: a review. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2015;**13**:137.
- Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;**18**:774–800.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, Jong FH de, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, *et al.* Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001;**142**:4891–4899.
- Durlinger AL, Kramer P, Karels B, Jong FH de, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999;**140**:5789–5796.
- Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JTJ, Grootegoed JA, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002;**143**:1076–1084.
- Echiburú B, Milagro F, Crisosto N, Pérez-Bravo F, Flores C, Arpón A, Salas-Pérez F, Recabarren SE, Sir-Petermann T, Maliqueo M. DNA methylation in promoter regions of genes involved in the reproductive and metabolic function of children born to women with PCOS. *Epigenetics* 2020;**15**:1178–1194.
- Escobar-Morreale HF. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2018;**14**:270–284.
- Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, San Millán JL. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* 2005;**26**:251–282.
- Fathy SA, Hamid FFA, Zabut BM, Jamee AF, Ali MAM, Mustafa AMA. Diagnostic utility of BNP, corin and furin as biomarkers for cardiovascular complications in type 2 diabetes mellitus patients. *Biomarkers* 2015;**20**:460–469.
- Fauser BCJM, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, Carmina E, Chang J, Yildiz BO, Laven JSE, *et al.* Consensus on women’s health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril* 2012;**97**:28-38.e25.
- Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE consensus on the definition of ‘poor response’ to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011;**26**:1616–1624.
- Fertility problems: assessment and treatment | recommendations | Guidance and guidelines | NICE Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg156/chapter/recommendations>.
- Filippou P, Homburg R. Is foetal hyperexposure to androgens a cause of PCOS? *Hum Reprod Update* 2017;**23**:421–432.

- Foecking EM, Szabo M, Schwartz NB, Levine JE. Neuroendocrine consequences of prenatal androgen exposure in the female rat: absence of luteinizing hormone surges, suppression of progesterone receptor gene expression, and acceleration of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator. *Biol Reprod* 2005;**72**:1475–1483.
- Fréour T, Barrière P, Masson D. Anti-müllerian hormone levels and evolution in women of reproductive age with breast cancer treated with chemotherapy. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2017;**74**:1–8.
- Garrel G, Denoyelle C, L'Hôte D, Picard J-Y, Teixeira J, Kaiser UB, Laverrière J-N, Cohen-Tannoudji J. GnRH Transactivates Human AMH Receptor Gene via Egr1 and FOXO1 in Gonadotrope Cells. *Neuroendocrinology* 2019;**108**:65–83.
- Garrel G, Racine C, L'Hôte D, Denoyelle C, Guigon CJ, Clemente N di, Cohen-Tannoudji J. Anti-Müllerian hormone: a new actor of sexual dimorphism in pituitary gonadotrope activity before puberty. *Sci Rep* 2016;**6**:srep23790.
- Gassner D, Jung R. First fully automated immunoassay for anti-Müllerian hormone. *Clin Chem Lab Med* 2014;**52**:1143–1152.
- Georgopoulos NA, Karagiannidou E, Koika V, Roupas ND, Armeni A, Marioli D, Papadakis E, Welt CK, Panidis D. Increased frequency of the anti-mullerian-inhibiting hormone receptor 2 (AMHR2) 482 A>G polymorphism in women with polycystic ovary syndrome: relationship to luteinizing hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;**98**:E1866-1870.
- Glintborg D, Jensen RC, Bentsen K, Schmedes AV, Brandslund I, Kyhl HB, Bilenberg N, Andersen MS. Testosterone Levels in Third Trimester in Polycystic Ovary Syndrome: Odense Child Cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;**103**:3819–3827.
- Gorsic LK, Dapas M, Legro RS, Hayes MG, Urbanek M. Functional Genetic Variation in the Anti-Müllerian Hormone Pathway in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;**104**:2855–2874.
- Gorsic LK, Kosova G, Werstein B, Sisk R, Legro RS, Hayes MG, Teixeira JM, Dunaif A, Urbanek M. Pathogenic Anti-Müllerian Hormone Variants in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;**102**:2862–2872.
- Griesinger G, Dafopoulos K, Buendgen N, Cascorbi I, Georgoulas P, Zavos A, Messini CI, Messinis IE. Elimination half-life of anti-Müllerian hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;**97**:2160–2163.
- Grøndahl ML, Nielsen ME, Dal Canto MB, Fadini R, Rasmussen IA, Westergaard LG, Kristensen SG, Yding Andersen C. Anti-Müllerian hormone remains highly expressed in human cumulus cells during the final stages of folliculogenesis. *Reprod Biomed Online* 2011;**22**:389–398.
- Grossman MP, Nakajima ST, Fallat ME, Siow Y. Müllerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. *Fertil Steril* 2008;**89**:1364–1370.

- Grynberg M, Pierre A, Rey R, Leclerc A, Arouche N, Hesters L, Catteau-Jonard S, Frydman R, Picard J-Y, Fanchin R, *et al.* Differential regulation of ovarian anti-müllerian hormone (AMH) by estradiol through α - and β -estrogen receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;**97**:E1649-1657.
- Gustafson ML, Lee MM, Asmundson L, MacLaughlin DT, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance in the diagnosis and management of intersex and gonadal abnormalities. *J Pediatr Surg* 1993;**28**:439–444.
- Hakim C, Padmanabhan V, Vyas AK. Gestational Hyperandrogenism in Developmental Programming. *Endocrinology* 2017;**158**:199–212.
- Haqq C, Lee MM, Tizard R, Wysk M, DeMarinis J, Donahoe PK, Cate RL. Isolation of the rat gene for Mullerian inhibiting substance. *Genomics* 1992;**12**:665–669.
- Hart R, Sloboda DM, Doherty DA, Norman RJ, Atkinson HC, Newnham JP, Dickinson JE, Hickey M. Circulating maternal testosterone concentrations at 18 weeks of gestation predict circulating levels of antimüllerian hormone in adolescence: a prospective cohort study. *Fertil Steril* 2010;**94**:1544–1547.
- Hayes E, Kushnir V, Ma X, Biswas A, Prizant H, Gleicher N, Sen A. Intra-cellular mechanism of Anti-Müllerian hormone (AMH) in regulation of follicular development. *Mol Cell Endocrinol* 2016;**433**:56–65.
- Helden J van, Weiskirchen R. Performance of the two new fully automated anti-Müllerian hormone immunoassays compared with the clinical standard assay. *Hum Reprod Oxf Engl* 2015;**30**:1918–1926.
- Hickey M, Sloboda DM, Atkinson HC, Doherty DA, Franks S, Norman RJ, Newnham JP, Hart R. The relationship between maternal and umbilical cord androgen levels and polycystic ovary syndrome in adolescence: a prospective cohort study. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;**94**:3714–3720.
- Homburg R, Gudi A, Shah A, Layton AM. A novel method to demonstrate that pregnant women with polycystic ovary syndrome hyper-expose their fetus to androgens as a possible stepping stone for the developmental theory of PCOS. A pilot study. *Reprod Biol Endocrinol* 2017;**15**:61.
- Houten EL a. F van, Themmen APN, Visser JA. Anti-Müllerian hormone (AMH): regulator and marker of ovarian function. *Ann Endocrinol* 2010;**71**:191–197.
- 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. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;**103**:4187–4196.
- Huang C-C, Tien Y-J, Chen M-J, Chen C-H, Ho H-N, Yang Y-S. Symptom patterns and phenotypic subgrouping of women with polycystic ovary syndrome: association between endocrine characteristics and metabolic aberrations. *Hum Reprod Oxf Engl* 2015;**30**:937–946.
- Hughesdon PE. Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called “hyperthecosis.” *Obstet Gynecol Surv* 1982;**37**:59–77.

- Hyldgaard J, Bor P, Ingerslev HJ, Tørring N. Comparison of two different methods for measuring anti-müllerian hormone in a clinical series. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2015;**13**:107.
- Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Navab A, Magoffin DA. Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein, and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**:1318–1323.
- Johnson AL, Haugen MJ, Woods DC. Role for inhibitor of differentiation/deoxyribonucleic acid-binding (Id) proteins in granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 2008;**149**:3187–3195.
- Jonard S, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Pigny P, Decanter C, Dewailly D. Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles? *Hum Reprod Oxf Engl* 2003;**18**:598–603.
- Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Revisiting the ovarian volume as a diagnostic criterion for polycystic ovaries. *Hum Reprod Oxf Engl* 2005;**20**:2893–2898.
- Josso N, Clemente N di. Transduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. *Trends Endocrinol Metab TEM* 2003;**14**:91–97.
- Jost A. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. III. Rôle des gonades foetales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch Anat Microsc Morph Exp* 1947;**36**:271–315.
- Kano M, Sosulski AE, Zhang L, Saatcioglu HD, Wang D, Nagykerly N, Sabatini ME, Gao G, Donahoe PK, Pépin D. AMH/MIS as a contraceptive that protects the ovarian reserve during chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;**114**:E1688–E1697.
- Kedem A, Hourvitz A, Yung Y, Shalev L, Yerushalmi GM, Kanety H, Hanochi M, Maman E. Anti-Müllerian hormone (AMH) downregulation in late antral stages is impaired in PCOS patients. A study in normo-ovulatory and PCOS patients undergoing in vitro maturation (IVM) treatments. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol* 2013;**29**:651–656.
- Kedem-Dickman A, Maman E, Yung Y, Yerushalmi GM, Hemi R, Hanochi M, Dor J, Hourvitz A. Anti-Müllerian hormone is highly expressed and secreted from cumulus granulosa cells of stimulated preovulatory immature and atretic oocytes. *Reprod Biomed Online* 2012;**24**:540–546.
- Kelley AS, Smith YR, Padmanabhan V. A Narrative Review of Placental Contribution to Adverse Pregnancy Outcomes in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;**104**:5299–5315.
- Kelsey TW, Wright P, Nelson SM, Anderson RA, Wallace WHB. A validated model of serum anti-müllerian hormone from conception to menopause. *PLoS One* 2011;**6**:e22024.
- Kevenaar ME, Laven JSE, Fong SL, Uitterlinden AG, Jong FH de, Themmen APN, Visser JA. A functional anti-müllerian hormone gene polymorphism is associated with follicle number and androgen levels in polycystic ovary syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**:1310–1316.

- Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, Lang-Born BMN van de, Jong FH de, Groome NP, Themmen APN, Visser JA. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* 2006;**147**:3228–3234.
- Kim JH, MacLaughlin DT, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone: A novel treatment for gynecologic tumors. *Obstet Gynecol Sci* 2014;**57**:343–357.
- Kollmann M, Obermayer-Pietsch B, Lerchbaum E, Lang U, Herzog SA, Trummer C, Scheuchenegger A, Ulrich D, Klaritsch P. Androgen and Anti-Mullerian Hormone Concentrations at Term in Newborns and Their Mothers with and without Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Med* 2019;**8**:1817.
- Königer A, Kampmeier A, Schmidt B, Frank M, Strowitzki T, Kimmig R, Gellhaus A, Mach P. Trends in anti-Müllerian hormone concentrations across different stages of pregnancy in women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online* 2018;
- Kreeger PK, Fernandes NN, Woodruff TK, Shea LD. Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional in vitro culture system is dependent on follicle stage and dose. *Biol Reprod* 2005;**73**:942–950.
- Kristensen SG, Kumar A, Kalra B, Pors SE, Bøtkjær JA, Mamsen LS, Colmorn LB, Fedder J, Ernst E, Owens LA, *et al.* Quantitative Differences in TGF- β Family Members Measured in Small Antral Follicle Fluids From Women With or Without PCO. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;**104**:6371–6384.
- Kristensen SG, Mamsen LS, Jeppesen JV, Bøtkjær JA, Pors SE, Borgbo T, Ernst E, Macklon KT, Andersen CY. Hallmarks of Human Small Antral Follicle Development: Implications for Regulation of Ovarian Steroidogenesis and Selection of the Dominant Follicle. *Front Endocrinol* 2017;**8**:376.
- Kuijper E a. M, Ket JCF, Caanen MR, Lambalk CB. Reproductive hormone concentrations in pregnancy and neonates: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 2013;**27**:33–63.
- La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artenisio AC, Stabile G, Volpe A. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 2010;**16**:113–130.
- Lahbib-Mansais Y, Barbosa A, Yerle M, Parma P, Milan D, Pailhoux E, Gellin J, Cotinot C. Mapping in pig of genes involved in sexual differentiation: AMH, WT1, FTZF1, SOX2, SOX9, AHC, and placental and embryonic CYP19. *Cytogenet Cell Genet* 1997;**76**:109–114.
- Lambertini L, Saul SR, Copperman AB, Hammerstad SS, Yi Z, Zhang W, Tomer Y, Kase N. Intrauterine Reprogramming of the Polycystic Ovary Syndrome: Evidence from a Pilot Study of Cord Blood Global Methylation Analysis. *Front Endocrinol* [Internet] 2017;**8**.
- Lebeurrier N, Launay S, Macrez R, Maubert E, Legros H, Leclerc A, Jamin SP, Picard J-Y, Marret S, Laudénbach V, *et al.* Anti-Mullerian-hormone-dependent regulation of the brain serine-protease inhibitor neuroserpin. *J Cell Sci* 2008;**121**:3357–3365.

- Lie Fong S, Visser JA, Welt CK, Rijke YB de, Eijkemans MJC, Broekmans FJ, Roes EM, Peters WHM, Hokken-Koelega ACS, Fauser BCJM, *et al.* Serum anti-müllerian hormone levels in healthy females: a nomogram ranging from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;**97**:4650–4655.
- Lutterodt M, Byskov AG, Skouby SO, Tabor A, Yding Andersen C. Anti-Müllerian hormone in pregnant women in relation to other hormones, fetal sex and in circulation of second trimester fetuses. *Reprod Biomed Online* 2009;**18**:694–699.
- Maciel GAR, Baracat EC, Benda JA, Markham SM, Hensinger K, Chang RJ, Erickson GF. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;**89**:5321–5327.
- Maliqueo M, Lara HE, Sánchez F, Echiburú B, Crisosto N, Sir-Petermann T. Placental steroidogenesis in pregnant women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;**166**:151–155.
- Maliqueo M, Sundström Poromaa I, Vanky E, Fornes R, Benrick A, Åkerud H, Stridsklev S, Labrie F, Jansson T, Stener-Victorin E. Placental STAT3 signaling is activated in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Oxf Engl* 2015;**30**:692–700.
- Malone SA, Papadakis GE, Messina A, Mimouni NEH, Trova S, Imbernon M, Allet C, Cimino I, Acierno J, Cassatella D, *et al.* Defective AMH signaling disrupts GnRH neuron development and function and contributes to hypogonadotropic hypogonadism. *eLife* 2019;**8**.
- Mamsen LS, Petersen TS, Jeppesen JV, Møllgård K, Grøndahl ML, Larsen A, Ernst E, Oxvig C, Kumar A, Kalra B, *et al.* Proteolytic processing of anti-Müllerian hormone differs between human fetal testes and adult ovaries. *MHR Basic Sci Reprod Med* 2015;**21**:571–582.
- Matsuzaki T, Munkhzaya M, Iwasa T, Tungalagsuvd A, Yano K, Mayila Y, Yanagihara R, Tokui T, Kato T, Kuwahara A, *et al.* Relationship between serum anti-Müllerian hormone and clinical parameters in polycystic ovary syndrome. *Endocr J* 2017;**64**:531–541.
- McCredie S, Ledger W, Venetis CA. Anti-Müllerian hormone kinetics in pregnancy and post-partum: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 2017;**34**:522–533.
- McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJ. Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biol Reprod* 2001;**64**:293–298.
- McLennan IS, Pankhurst MW. Anti-Müllerian hormone is a gonadal cytokine with two circulating forms and cryptic actions. *J Endocrinol* 2015;**226**:R45–R57.
- Mehrabian F, Kelishadi R. Comparison of the metabolic parameters and androgen level of umbilical cord blood in newborns of mothers with polycystic ovary syndrome and controls. *J Res Med Sci Off J Isfahan Univ Med Sci* 2012;**17**:207–211.
- Mimouni NEH, Paiva I, Barbotin A-L, Timzoura FE, Plassard D, Gras SL, Ternier G, Pigny P, Catteau-Jonard S, Simon V, *et al.* Polycystic ovary syndrome is transmitted via a transgenerational epigenetic process. *Cell Metab* 2021;**33**:513-530.e8. Elsevier.

- Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, Cate RL, Behringer RR. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev* 1996;**10**:2577–2587.
- Monniaux D, Genêt C, Maillard V, Jarrier P, Adriaensen H, Hennequet-Antier C, Lainé A-L, Laclie C, Papillier P, Plisson-Petit F, *et al.* Prenatal programming by testosterone of follicular theca cell functions in ovary. *Cell Mol Life Sci* [Internet] 2019; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03230-1>.
- Morales AJ, Laughlin GA, Bützow T, Maheshwari H, Baumann G, Yen SS. Insulin, somatotrophic, and luteinizing hormone axes in lean and obese women with polycystic ovary syndrome: common and distinct features. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;**81**:2854–2864.
- Moran LJ, Misso ML, Wild RA, Norman RJ. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2010;**16**:347–363.
- Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;**80**:3689–3698.
- Münsterberg A, Lovell-Badge R. Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Dev Camb Engl* 1991;**113**:613–624.
- Nachtigal MW, Ingraham HA. Bioactivation of Müllerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/subtilisin-like endoprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**:7711–7716.
- Nelson SM, Messow MC, McConnachie A, Wallace H, Kelsey T, Fleming R, Anderson RA, Leader B. External validation of nomogram for the decline in serum anti-Müllerian hormone in women: a population study of 15,834 infertility patients. *Reprod Biomed Online* 2011;**23**:204–206.
- Nelson SM, Pastuszek E, Kloss G, Malinowska I, Liss J, Lukaszuk A, Plociennik L, Lukaszuk K. Two new automated, compared with two enzyme-linked immunosorbent, antimüllerian hormone assays. *Fertil Steril* 2015;**104**:1016-1021.e6.
- Nelson SM, Stewart F, Fleming R, Freeman DJ. Longitudinal assessment of antimüllerian hormone during pregnancy-relationship with maternal adiposity, insulin, and adiponectin. *Fertil Steril* 2010;**93**:1356–1358.
- Nestler JE. Insulin and insulin-like growth factor-I stimulate the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity of human placental cytotrophoblasts. *Endocrinology* 1989;**125**:2127–2133.
- Nestler JE. Regulation of the aromatase activity of human placental cytotrophoblasts by insulin, insulin-like growth factor-I, and -II. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;**44**:449–457.
- Nestler JE, Jakubowicz DJ. Decreases in ovarian cytochrome P450c17 alpha activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1996;**335**:617–623.

- Nilsson EE, Schindler R, Savenkova MI, Skinner MK. Inhibitory actions of Anti-Müllerian Hormone (AMH) on ovarian primordial follicle assembly. *PLoS One* 2011;**6**:e20087.
- Novembri R, Funghi L, Voltolini C, Belmonte G, Vannuccini S, Torricelli M, Petraglia F. Placenta expresses anti-Müllerian hormone and its receptor: Sex-related difference in fetal membranes. *Placenta* 2015;**36**:731–737.
- Oreal E, Pieau C, Mattei MG, Josso N, Picard JY, Carré-Eusèbe D, Magre S. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 1998;**212**:522–532.
- Osei-Kumah A, Smith R, Jurisica I, Caniggia I, Clifton VL. Sex-specific differences in placental global gene expression in pregnancies complicated by asthma. *Placenta* 2011;**32**:570–578.
- Owens LA, Kristensen SG, Lerner A, Christopoulos G, Lavery S, Hanyaloglu AC, Hardy K, Yding Andersen C, Franks S. Gene Expression in Granulosa Cells From Small Antral Follicles From Women With or Without Polycystic Ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;**104**:6182–6192.
- Pabalan N, Montagna E, Singian E, Tabangay L, Jarjanazi H, Barbosa CP, Bianco B. Associations of Polymorphisms in Anti-Müllerian Hormone (AMH Ile49Ser) and its Type II Receptor (AMHRII -482 A>G) on Reproductive Outcomes and Polycystic Ovary Syndrome: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 2016;**39**:2249–2261.
- Padmanabhan V, Cardoso RC, Puttabyatappa M. Developmental Programming, a Pathway to Disease. *Endocrinology* 2016;**157**:1328–1340.
- Palomba S, Marotta R, Di Cello A, Russo T, Falbo A, Orio F, Tolino A, Zullo F, Esposito R, La Sala GB. Pervasive developmental disorders in children of hyperandrogenic women with polycystic ovary syndrome: a longitudinal case-control study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012;**77**:898–904.
- Palomba S, Wilde MA de, Falbo A, Koster MPH, La Sala GB, Fauser BCJM. Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2015;**21**:575–592.
- Pankhurst MW, Chong YH, McLennan IS. Enzyme-linked immunosorbent assay measurements of antimüllerian hormone (AMH) in human blood are a composite of the uncleaved and bioactive cleaved forms of AMH. *Fertil Steril* 2014;**101**:846–850.
- Pankhurst MW, Chong YH, McLennan IS. Relative levels of the proprotein and cleavage-activated form of circulating human anti-Müllerian hormone are sexually dimorphic and variable during the life cycle. *Physiol Rep* 2016a;**4**:e12783.
- Pankhurst MW, Clark CA, Zarek J, Laskin CA, McLennan IS. Changes in Circulating ProAMH and Total AMH during Healthy Pregnancy and Post-Partum: A Longitudinal Study. *PLoS One* 2016b;**11**:e0162509.
- Pankhurst MW, Kat AC de, Jones S, Broekmans FJM, Wheeler BJ. Serum anti-Müllerian hormone levels in women are unstable in the postpartum period but return to normal within 5 months: a longitudinal study. *Endocrine* 2020;

- Pankhurst MW, McLennan IS. Human blood contains both the uncleaved precursor of anti-Müllerian hormone and a complex of the NH₂- and COOH-terminal peptides. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;**305**:E1241-1247.
- Pankhurst MW, McLennan IS. A specific immunoassay for proAMH, the uncleaved proprotein precursor of anti-Müllerian hormone. *Mol Cell Endocrinol* 2016;**419**:165–171.
- Pankhurst MW, Shorakae S, Rodgers RJ, Teede HJ, Moran LJ. Efficacy of predictive models for polycystic ovary syndrome using serum levels of two antimüllerian hormone isoforms (proAMH and AMHN,C). *Fertil Steril* 2017;**108**:851-857.e2.
- Pask AJ, Whitworth DJ, Mao C-A, Wei K-J, Sankovic N, Graves JAM, Shaw G, Renfree MB, Behringer RR. Marsupial anti-Müllerian hormone gene structure, regulatory elements, and expression. *Biol Reprod* 2004;**70**:160–167.
- Pastor CL, Griffin-Korf ML, Aloï JA, Evans WS, Marshall JC. Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:582–590.
- Peigné M, Catteau-Jonard S, Robin G, Dumont A, Pigny P, Dewailly D. The numbers of 2- 5 and 6-9 mm ovarian follicles are inversely correlated in both normal women and in polycystic ovary syndrome patients: what is the missing link? *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;**33**:706–714.
- 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 RBE* 2014;**12**:26.
- Peigné M, Dewailly D. Long term complications of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Ann Endocrinol* 2014;**75**:194–199.
- Peigné M, Pigny P, Pankhurst MW, Drumez E, Loyens A, Dewailly D, Catteau-Jonard S, Giacobini P. The proportion of cleaved anti-Müllerian hormone is higher in serum but not follicular fluid of obese women independently of polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online* 2020;**41**:1112–1121.
- Peigné M, Robin G, Catteau-Jonard S, Giacobini P, Dewailly D, Pigny P. [How to deal with the different serum AMH kits in France in 2017?]. *Gynecol Obstet Fertil Senol* 2017;**45**:558–565.
- Pellatt L, Hanna L, Brincat M, Galea R, Brain H, Whitehead S, Mason H. Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**:240–245.
- Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, Brown K, Simpson ER, Mason HD. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril* 2011;**96**:1246-1251.e1.
- Pellatt L, Rice S, Mason HD. Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome: a mountain too high? *Reprod Camb Engl* 2010;**139**:825–833.

- Pepinsky RB, Sinclair LK, Chow EP, Mattaliano RJ, Manganaro TF, Donahoe PK, Cate RL. Proteolytic processing of mullerian inhibiting substance produces a transforming growth factor-beta-like fragment. *J Biol Chem* 1988;**263**:18961–18964.
- Peuranpää P, Hautamäki H, Halttunen-Nieminen M, Hydén-Granskog C, Tiitinen A. Low anti-Müllerian hormone level is not a risk factor for early pregnancy loss in IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod* 2020;**35**:504–515.
- Picard JY, Benarous R, Guerrier D, Josso N, Kahn A. Cloning and expression of cDNA for anti-müllerian hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;**83**:5464–5468.
- Picard JY, Josso N. Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol Cell Endocrinol* 1984;**34**:23–29.
- Pierre A, Peigné M, Grynberg M, Arouche N, Taieb J, Hesters L, Gonzalès J, Picard J-Y, Dewailly D, Fanchin R, *et al.* Loss of LH-induced down-regulation of anti-Müllerian hormone receptor expression may contribute to anovulation in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2013;**28**:762–769.
- Pierre A, Racine C, Rey RA, Fanchin R, Taieb J, Cohen-Tannoudji J, Carmillo P, Pepinsky RB, Cate RL, Clemente N di. Most Cleaved Anti-Müllerian Hormone Binds Its Receptor in Human Follicular Fluid but Little Is Competent in Serum. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;**101**:4618–4627.
- Pierre A, Taieb J, Giton F, Grynberg M, Touleimat S, El Hachem H, Fanchin R, Monniaux D, Cohen-Tannoudji J, Clemente N di, *et al.* Dysregulation of the Anti-Müllerian Hormone System by Steroids in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;**102**:3970–3978.
- Pigny P. Le dosage plasmatique de l’hormone anti-müllérienne : où en est-on en 2013 ? [Anti-Müllerian hormone assay : what’s up in 2013 ?]. *Médecine Reprod Gynécologie Endocrinol* 2014;**16**:16–20.
- Pigny P, Gorisse E, Ghulam A, Robin G, Catteau-Jonard S, Duhamel A, Dewailly D. Comparative assessment of five serum antimüllerian hormone assays for the diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2016;**105**:1063-1069.e3.
- Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Serum anti-Müllerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:941–945.
- Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. Elevated Serum Level of Anti-Müllerian Hormone in Patients with Polycystic Ovary Syndrome: Relationship to the Ovarian Follicle Excess and to the Follicular Arrest. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:5957–5962.

- Piltonen TT, Giacobini P, Edvinsson Å, Hustad S, Lager S, Morin-Papunen L, Tapanainen JS, Sundström-Poromaa I, Arffman RK. Circulating antimüllerian hormone and steroid hormone levels remain high in pregnant women with polycystic ovary syndrome at term. *Fertil Steril* 2019;**111**:588-596.e1.
- Piouka A, Farmakiotis D, Katsikis I, Macut D, Gerou S, Panidis D. Anti-Müllerian hormone levels reflect severity of PCOS but are negatively influenced by obesity: relationship with increased luteinizing hormone levels. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2009;**296**:E238–E243.
- Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev* 1999;**20**:535–582.
- Racine C, Genêt C, Bourgneuf C, Dupont C, Plisson-Petit F, Sarry J, Hennequet-Antier C, Vigouroux C, Mathieu d'Argent E, Pierre A, *et al.* New Anti-Müllerian Hormone Target Genes Involved in Granulosa Cell Survival in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2021;**106**:e1271–e1289.
- Raperport C, Homburg R. The Source of Polycystic Ovarian Syndrome. *Clin Med Insights Reprod Health* 2019;**13**:1179558119871467.
- Ren K, Jiang T, Zheng X-L, Zhao G-J. Proprotein convertase furin/PCSK3 and atherosclerosis: New insights and potential therapeutic targets. *Atherosclerosis* 2017;**262**:163–170.
- Renaud EJ, MacLaughlin DT, Oliva E, Rueda BR, Donahoe PK. Endometrial cancer is a receptor-mediated target for Mullerian Inhibiting Substance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:111–116.
- Risal S, Pei Y, Lu H, Manti M, Fornes R, Pui H-P, Zhao Z, Massart J, Ohlsson C, Lindgren E, *et al.* Prenatal androgen exposure and transgenerational susceptibility to polycystic ovary syndrome. *Nat Med* 2019;**25**:1894–1904.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod Oxf Engl* 2004;**19**:41–47.
- Saatcioglu HD, Kano M, Horn H, Zhang L, Samore W, Nagykerly N, Meinsohn M-C, Hyun M, Suliman R, Poulo J, *et al.* Single-cell sequencing of neonatal uterus reveals an *Misr2*⁺ endometrial progenitor indispensable for fertility. *eLife* 2019;**8**:e46349.
- Sacchi S, D'Ippolito G, Sena P, Marsella T, Tagliasacchi D, Maggi E, Argento C, Tirelli A, Giulini S, La Marca A. The anti-Müllerian hormone (AMH) acts as a gatekeeper of ovarian steroidogenesis inhibiting the granulosa cell response to both FSH and LH. *J Assist Reprod Genet* 2016;**33**:95–100.
- Sahmay S, Atakul N, Oncul M, Tuten A, Aydogan B, Seyisoglu H. Serum anti-Müllerian hormone levels in the main phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;**170**:157–161.

- Saif Z, Hodyl NA, Hobbs E, Tuck AR, Butler MS, Osei-Kumah A, Clifton VL. The human placenta expresses multiple glucocorticoid receptor isoforms that are altered by fetal sex, growth restriction and maternal asthma. *Placenta* 2014;**35**:260–268.
- Sathishkumar K, Elkins R, Chinnathambi V, Gao H, Hankins GDV, Yallampalli C. Prenatal testosterone-induced fetal growth restriction is associated with down-regulation of rat placental amino acid transport. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2011;**9**:110.
- Schmidt KLT, Kryger-Baggesen N, Byskov AG, Andersen CY. Anti-Müllerian hormone initiates growth of human primordial follicles in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 2005;**234**:87–93.
- Schulz RW, Bogerd J, Male R, Ball J, Fenske M, Olsen LC, Tyler CR. Estrogen-induced alterations in amh and dmrt1 expression signal for disruption in male sexual development in the zebrafish. *Environ Sci Technol* 2007;**41**:6305–6310.
- Segerstolpe Å, Palasantza A, Eliasson P, Andersson E-M, Andréasson A-C, Sun X, Picelli S, Sabirsh A, Clausen M, Bjursell MK, *et al.* Single-Cell Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes. *Cell Metab* 2016;**24**:593–607.
- Segev DL, Ha TU, Tran TT, Kenneally M, Harkin P, Jung M, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Maheswaran S. Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkappa B-mediated pathway. *J Biol Chem* 2000;**275**:28371–28379.
- Seifer DB, Merhi Z. Is AMH a regulator of follicular atresia? *J Assist Reprod Genet* 2014;**31**:1403–1407.
- Silva MSB, Giacobini P. New insights into anti-Müllerian hormone role in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and neuroendocrine development. *Cell Mol Life Sci* [Internet] 2020; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03576-x>.
- Sir-Petermann T, Codner E, Maliqueo M, Echiburú B, Hitschfeld C, Crisosto N, Pérez-Bravo F, Recabarren SE, Cassorla F. Increased anti-Müllerian hormone serum concentrations in prepubertal daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:3105–3109.
- Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Pérez-Bravo F, Recabarren SE. Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum Reprod Oxf Engl* 2002;**17**:2573–2579.
- Sir-Petermann T, Maliqueo M, Codner E, Echiburú B, Crisosto N, Pérez V, Pérez-Bravo F, Cassorla F. Early metabolic derangements in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**:4637–4642.
- Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 1935;**29**:181–191.
- Stener-Victorin E, Padmanabhan V, Walters KA, Campbell RE, Benrick A, Giacobini P, Dumesic DA, Abbott DH. Animal Models to Understand the Etiology and Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev* 2020;**41**:bnaa010.

- Stojšin-Carter A, Costa NN, De Morais R, De Bem TH, Costa MP, Carter TF, Gillis DJ, Neal MS, Ohashi OM, Miranda MS, *et al.* Fetal sex alters maternal anti-Müllerian hormone during pregnancy in cattle. *Anim Reprod Sci* 2017;**186**:85–92.
- Su HI, Sammel MD, Homer MV, Bui K, Haunschild C, Stanczyk FZ. Comparability of antimüllerian hormone levels among commercially available immunoassays. *Fertil Steril* 2014;**101**:1766-1772.e1.
- Sun M, Maliqueo M, Benrick A, Johansson J, Shao R, Hou L, Jansson T, Wu X, Stener-Victorin E. Maternal androgen excess reduces placental and fetal weights, increases placental steroidogenesis, and leads to long-term health effects in their female offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;**303**:E1373-1385.
- Sun M, Sun B, Qiao S, Feng X, Li Y, Zhang S, Lin Y, Hou L. Elevated maternal androgen is associated with dysfunctional placenta and lipid disorder in newborns of mothers with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2020;**113**:1275-1285.e2. Elsevier.
- Tadaion Far F, Jahanian Sadatmahalleh S, Ziaei S, Kazemnejad A. Comparison of the umbilical cord Blood's anti-Müllerian hormone level in the newborns of mothers with polycystic ovary syndrome (PCOS) and healthy mothers. *J Ovarian Res* 2019;**12**:111.
- Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: A user's guide. *Am J Obstet Gynecol* 2017;
- Tal R, Seifer DB, Khamov M, Malter HE, Grazi RV, Leader B. Characterization of women with elevated antimüllerian hormone levels (AMH): correlation of AMH with polycystic ovarian syndrome phenotypes and assisted reproductive technology outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2014;**211**:59.e1-8.
- Tata B, Mimouni NEH, Barbotin A-L, Malone SA, Loyens A, Pigny P, Dewailly D, Catteau-Jonard S, Sundström-Poromaa I, Piltonen TT, *et al.* Elevated prenatal anti-Müllerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood. *Nat Med* 2018;**24**:834–846.
- Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, Piltonen T, Norman RJ, International PCOS Network. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;**33**:1602–1618.
- The human protein atlas www.proteinatlas.org.
- Torchen LC, Legro RS, Dunaif A. Distinctive Reproductive Phenotypes in Peripubertal Girls at Risk for Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;**104**:3355–3361.
- Valdimarsdóttir R, Valgeirsdóttir H, Wikström A-K, Kallak TK, Elenis E, Axelsson O, Ubhayasekhara K, Bergquist J, Piltonen TT, Pigny P, *et al.* Pregnancy and neonatal complications in women with polycystic ovary syndrome in relation to second-trimester anti-Müllerian hormone levels. *Reprod Biomed Online* 2019;**39**:141–148.
- Vanky E, Carlsen SM. Androgens and antimüllerian hormone in mothers with polycystic ovary syndrome and their newborns. *Fertil Steril* 2012;**97**:509–515.

- Vembu R, Reddy NS. Serum AMH Level to Predict the Hyper Response in Women with PCOS and Non-PCOS Undergoing Controlled Ovarian Stimulation in ART. *J Hum Reprod Sci* 2017;**10**:91–94.
- Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J Clin Invest* 1998;**101**:2622–2629.
- Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 1984;**114**:1315–1320.
- Visser JA, Durlinger ALL, Peters IJJ, Heuvel ER van den, Rose UM, Kramer P, Jong FH de, Themmen APN. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Müllerian hormone null mice. *Endocrinology* 2007;**148**:2301–2308.
- Visser JA, Jong FH de, Laven JSE, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reprod Camb Engl* 2006;**131**:1–9.
- Visser JA, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2005;**234**:81–86.
- Walters KA, Gilchrist RB, Ledger WL, Teede HJ, Handelsman DJ, Campbell RE. New Perspectives on the Pathogenesis of PCOS: Neuroendocrine Origins. *Trends Endocrinol Metab TEM* 2018;**29**:841–852.
- Wang F, Niu W-B, Kong H-J, Guo Y-H, Sun Y-P. The role of AMH and its receptor SNP in the pathogenesis of PCOS. *Mol Cell Endocrinol* 2017;**439**:363–368.
- Wang J, Dicken C, Lustbader JW, Tortoriello DV. Evidence for a Müllerian-inhibiting substance autocrine/paracrine system in adult human endometrium. *Fertil Steril* 2009;**91**:1195–1203.
- Wang P-Y, Koishi K, McGeachie AB, Kimber M, Maclaughlin DT, Donahoe PK, McLennan IS. Mullerian inhibiting substance acts as a motor neuron survival factor in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:16421–16425.
- Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, Franks S. Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet Lond Engl* 2003;**362**:1017–1021.
- Webber LJ, Stubbs SA, Stark J, Margara RA, Trew GH, Lavery SA, Hardy K, Franks S. Prolonged survival in culture of preantral follicles from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;**92**:1975–1978.
- Weenen C, Laven JSE, Von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BCJM, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;**10**:77–83.
- Western PS, Harry JL, Graves JA, Sinclair AH. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 1999;**216**:411–419.

- Wickenheisser JK, Nelson-Degrave VL, McAllister JM. Dysregulation of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase messenger ribonucleic acid stability in theca cells isolated from women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**:1720–1727.
- Wickenheisser JK, Quinn PG, Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, McAllister JM. Differential activity of the cytochrome P450 17alpha-hydroxylase and steroidogenic acute regulatory protein gene promoters in normal and polycystic ovary syndrome theca cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**:2304–2311.
- Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E, Dokras A, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Lobo R, Norman RJ, Talbott E, Dumesic DA. Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;**95**:2038–2049.
- Willis DS, Watson H, Mason HD, Galea R, Brincat M, Franks S. Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:3984–3991.
- Wilson CA, Clemente N di, Ehrenfels C, Pepinsky RB, Josso N, Vigier B, Cate RL. Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol Baltim Md* 1993;**7**:247–257.
- Wissing ML, Mikkelsen AL, Kumar A, Kalra B, Pors SE, Flachs EM, Andersen CY. Associations of different molecular forms of antimüllerian hormone and biomarkers of polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril* 2019;**112**:149-155.e1.
- Wood JR, Ho CKM, Nelson-Degrave VL, McAllister JM, Strauss JF. The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling. *J Reprod Immunol* 2004;**63**:51–60.
- Wood JR, Nelson VL, Ho C, Jansen E, Wang CY, Urbanek M, McAllister JM, Mosselman S, Strauss JF. The molecular phenotype of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells and new candidate PCOS genes defined by microarray analysis. *J Biol Chem* 2003;**278**:26380–26390.
- Xu J, Bishop CV, Lawson MS, Park BS, Xu F. Anti-Müllerian hormone promotes pre-antral follicle growth, but inhibits antral follicle maturation and dominant follicle selection in primates. *Hum Reprod Oxf Engl* 2016;**31**:1522–1530.
- Yeganegi M, Leung CG, Martins A, Kim SO, Reid G, Challis JRG, Bocking AD. Lactobacillus rhamnosus GR-1 stimulates colony-stimulating factor 3 (granulocyte) (CSF3) output in placental trophoblast cells in a fetal sex-dependent manner. *Biol Reprod* 2011;**84**:18–25.
- Zarek SM, Mitchell EM, Sjaarda LA, Mumford SL, Silver RM, Stanford JB, Galai N, White MV, Schliep KC, DeCherney AH, *et al.* Is Anti-Müllerian Hormone Associated With Fecundability? Findings From the EAGeR Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;**100**:4215–4221.

Zhou S, Lu D, Wen S, Sheng Y, Kang D, Xu L. Elevated Anti-Müllerian Hormone Levels in Newborns of Women with Polycystic Ovary Syndrome: a Systematic Review and Meta-analysis Based on Observational Studies. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif* 2021;

Annexe 1 : Publications en lien avec le travail de thèse par ordre chronologique

Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie 45 (2017) 558–565



Disponible en ligne sur

ScienceDirect

www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte

www.em-consulte.com



Mise au point

Les différentes trousse de dosage d'AMH en France en 2017 : comment s'y retrouver en pratique clinique quotidienne ?



How to deal with the different serum AMH kits in France in 2017?

M. Peigné^{a,*}, G. Robin^b, S. Catteau-Jonard^b, P. Giacobini^c, D. Dewailly^b, P. Pigny^d

^a Unité de médecine de la reproduction, service de gynécologie-obstétrique, hôpital Bichat-Claude-Bernard, AP-HP, 46, rue Henri-Huchard, 75018 Paris, France

^b Service de gynécologie-endocrinienne et médecine de la reproduction, hôpital Jeanne-de-Flandre, CHRU de Lille, rue Eugène-Avinée, 59000 Lille, France

^c Unité 1172-eq 2, Inserm, laboratoire de développement et plasticité du cerveau neuroendocrine, JPArc, centre de recherche Jean-Pierre-Aubert, neurosciences et cancer, place de Verdun, 59045 Lille, France

^d Service de biochimie et hormonologie, centre de biologie pathologie, CHRU de Lille, boulevard du Professeur-J.-Leclercq, 59000 Lille, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 2 juin 2017

Accepté le 29 août 2017

Disponible sur Internet le 28 septembre 2017

Mots clés :

AMH

Dosage

AMP

Automatisé

Comparaison

Trousses

RÉSUMÉ

Le dosage d'hormone anti-müllérienne (AMH) est devenu un incontournable en pratique clinique quotidienne, en particulier avant une prise en charge en assistance médicale à la procréation (AMP). Cependant, de nombreuses trousse de dosage existent qui ne rendent pas des résultats équivalents, pouvant induire une confusion dans l'interprétation des valeurs d'AMH par le clinicien. Jusqu'à récemment, seuls existaient des dosages Elisa manuels (principalement Gen II Beckman, EIA/AMH Immunotech et les deux dosages d'Anshlab), dont les résultats n'étaient pas interchangeable. Les valeurs seuils hautes et basses, utiles en particulier pour l'adaptation thérapeutique en AMP, étaient variables entre les trousse. L'arrivée sur le marché fin 2014 de deux dosages automatisés (Access Dxi Beckman et AMH Elecsys Roche) semble améliorer la sensibilité et la reproductibilité des mesures de l'AMH ce qui pourrait simplifier l'interprétation du dosage et ainsi la prise en charge de nos patients. Cette revue synthétise les comparatifs entre les différents dosages d'AMH disponibles en 2017 pour aider le clinicien dans sa pratique quotidienne.

© 2017 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

ABSTRACT

Serum AMH measurement became a key element in clinical practice, especially before using Assisted reproductive techniques (ART). However, many AMH kits exist giving different AMH results, leading to a confusion in their interpretation. Until recently, only manual ELISA kits existed (mainly Gen II Beckman, EIA/AMH Immunotech and two Anshlab kits) reporting non-interchangeable results. High and low AMH cut-off values, mainly useful to adapt therapeutics in ART, were different between kits. Since the end of 2014, the arrival of two automatic assays (Access Dxi Beckman and AMH Elecsys Roche) seems to improve the sensitivity and the reproducibility of AMH measurement. It could simplify the interpretation of AMH values and improve our clinical choices. This review synthesizes the main comparisons between the different AMH kits available in 2017 to help clinicians in their daily clinical practice.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords:

AMH

Kits

ART

Comparison

Automated

Measurement

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : maeliss.peigne@aphp.fr (M. Peigné).

1. Introduction

Chez la femme, l'hormone anti-müllérienne (AMH), membre de la famille du *transforming growth factor* β (TGF β), est sécrétée par les cellules de la granulosa des follicules préantraux et petits antraux [1]. Elle est impliquée dans l'inhibition du recrutement

The numbers of 2–5 and 6–9 mm ovarian follicles are inversely correlated in both normal women and in polycystic ovary syndrome patients: what is the missing link?

M. Peigné^{1,3,*}, S. Catteau-Jonard¹, G. Robin¹, A. Dumont¹, P. Pigny², and D. Dewailly¹

¹CHU Lille, Service de Gynécologie-Endocrinienne et Médecine de la Reproduction, Hôpital Jeanne de Flandre, rue Eugène Avinée 59000, Lille, France ²CHU Lille, Service de Biochimie et Hormonologie, Centre de Biologie Pathologie, Bd du Professeur J. Leclercq 59000, Lille, France ³Present address: AP-HP, Unité de Médecine de la Reproduction, Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Bichat-Claude Bernard, 46 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France

*Correspondence address. APHP, Unité de Médecine de la Reproduction, Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Bichat-Claude Bernard, 46 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. Tel: +33-14-025-7679; Fax: +33-14-025-7600; E-mail: maeliss.peigne@aphp.fr

Submitted on November 13, 2017; resubmitted on January 3, 2018; accepted on January 15, 2018

STUDY QUESTION: Is the negative correlation between the numbers of 2–5 and 6–9 mm follicles influenced by ovarian and/or metabolic parameter(s) in young control women and in patients with polycystic ovarian syndrome (PCOS)?

SUMMARY ANSWER: Our study confirmed that the negative correlation between numbers of follicles sized 2–5 and 6–9 mm was stronger in PCOS than in young control women and was not linked to any ovarian or metabolic parameter.

WHAT IS KNOWN ALREADY: Previous reports described a direct negative correlation between the number of small antral follicles (2–5 mm) and large antral follicle (6–9 mm) during the early follicular phase (cycle Days 2–5) in normal and PCOS women. Numerous factors, that could be either intrinsic to the ovary or secondary to metabolic influence and/or gonadotropin regulation, might account for this.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION: Six hundred and thirty-nine patients with PCOS according to Rotterdam Criteria and 157 control women were recruited in this retrospective cross-sectional study from January 2009 to January 2016.

PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS: Data were obtained from a database of clinical, hormonal and ultrasound (U/S) features recorded consecutively in a single reproductive medicine centre. Univariate correlations between the various parameters were analysed by the Spearman's correlation test. All variables significantly related to the 2–5 and/or 6–9 mm follicle numbers were included in a principal component analysis (PCA) in order to structure the data and to obtain collections of uncorrelated variables, called principal components (PC), which are linear combinations of the original variables.

MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE: By univariate analysis, the 2–5 and 6–9 mm follicle numbers were strongly but negatively correlated in both populations. Many other variables were correlated to the 2–5 and/or 6–9 mm follicle numbers and to each other. By PCA, these relationships were gathered into four independent PCs in each population. In both groups, the 2–5 and 6–9 mm follicle numbers correlated strongly and inversely to a specific PC. Among the other variables tested, only serum oestradiol level correlated weakly to this PC in the control group. Two other uncorrelated PCs gathered relationships between variables linked to the metabolic status and the gonadotropin regulation both in control and PCOS women. Lastly, a fourth PC included relationships which linked to ovarian ageing in controls and to follicle dysregulation in patients with PCOS.

LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION: Our controls did not represent the general population since they were recruited in an ART centre; we used a modified Rotterdam classification for PCOS using follicle count and/or serum AMH level with in-house thresholds to define the follicle excess; the AMH assay used is no longer commercially available.

Emerging Roles of Anti-Müllerian Hormone in Hypothalamic-Pituitary Function

Anne-Laure Barbotin^{a, b} Maëliiss Peigné^{a, c} Samuel Andrew Malone^a Paolo Giacobini^a

^aUniversité de Lille, Inserm, CHU Lille, UMR-S 1172, Laboratoire du Développement et Plasticité du Cerveau Neuroendocrine, Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, Lille, France; ^bInstitut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS, CHU de Lille, Lille, France; ^cAP-HP, Unité de Médecine de la Reproduction, Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France

Keywords

Anti-Müllerian hormone · Hypothalamic-pituitary function · Polycystic ovary syndrome

Abstract

Since its initial discovery in the 1940s, research into the physiological actions of anti-Müllerian hormone (AMH), from its eponymous role in male developmental biology to its routine clinical use in female reproductive health, has undergone a paradigm shifting change. With several exciting studies recently reporting hitherto unforeseen AMH actions at all levels in the hypogonadal-pituitary-gonadal axis, the importance of this hormone for both hypothalamic and pituitary reproductive control is finding increasing support and significance. In this review, we will briefly summarize what is known about the traditional roles and biology of AMH and how this could be integrated with new findings of AMH actions at the level of the hypothalamic-pituitary axis. We also synthesize the important findings from these new studies and discuss their potential impact and significance to our understanding of one of the most common reproductive disorders currently affecting women, polycystic ovary syndrome.

© 2019 The Author(s)
Published by S. Karger AG, Basel

Introduction

Anti-Müllerian hormone (AMH) is a homodimeric glycoprotein belonging to the transforming growth factor (TGF)- β family [1] and was initially identified for its role in regression of the Müllerian ducts in male embryos [2]. Prof. Jost [2] found that the Müllerian ducts of the rabbit would independently differentiate into the female reproductive system (i.e., the uterus, the fallopian tubes, and the upper two thirds of the vagina) in the absence of testicular secretions. Following gonadectomy of sexually undifferentiated rabbits, Jost [2] grafted either ovarian or testicular tissue in rabbits and witnessed the subsequent correct development of either female or male genitalia, respectively. The paradigm-shifting experiment came when, following gonadectomy, he implanted a testosterone propionate crystal alone, noting that while the wolffian ducts were stimulated to develop, there was no regression of the Müllerian ducts – highlighting that a testicular factor other than testosterone was responsible for gonadal differentiation. Jost and Jost [3] called this factor “hormone in-

Samuel Andrew Malone and Paolo Giacobini contributed equally to this review.

KARGER

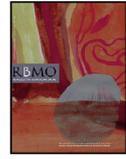
E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/nen

© 2019 The Author(s)
Published by S. Karger AG, Basel

Karger
Open access

This article is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (CC BY-NC-ND) (<http://www.karger.com/Services/OpenAccessLicense>). Usage and distribution for commercial purposes as well as any distribution of modified material requires written permission.

Paolo Giacobini
Laboratoire du Développement et Plasticité du Cerveau Neuroendocrine
Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, 1 Place de Verdun
FR-59045 Lille Cedex (France)
E-Mail paolo.giacobini@inserm.fr



ARTICLE

The proportion of cleaved anti-Müllerian hormone is higher in serum but not follicular fluid of obese women independently of polycystic ovary syndrome



BIOGRAPHY

Maëliiss Peigné is a gynaecologist, sub-specializing in reproductive medicine. She works at AP-HP- Université Sorbonne Paris Nord, Bondy, France, and is also a PhD student at INSERMu1172, Lille, France. Her main research interests include polycystic ovary syndrome pathophysiology and management, fertility preservation and improvement of assisted reproductive technology results.

Maëliiss Peigné^{1,2,3,*}, Pascal Pigny^{1,4}, Michaël W. Pankhurst⁵,
Elodie Drumez^{6,7}, Anne Loyens¹, Didier Dewailly^{1,3},
Sophie Catteau-Jonard^{1,3,†}, Paolo Giacobini^{1,*†}

KEY MESSAGE

A lower proportion of proAMH is detectable in the serum of obese versus normal weight women independently of polycystic ovary syndrome status. In the follicular fluid, this difference is not found, suggesting that conversion of proAMH into the active isoform occurs in extra-ovarian tissues and is exacerbated in obese individuals.

ABSTRACT

Research question: Does the relative distribution of anti-Müllerian hormone (AMH) isoforms differ between patients depending on their body mass index (BMI) and polycystic ovary syndrome (PCOS) status in serum and follicular fluid?

Design: Obese and normal weight patients (PCOS [$n = 70$]; non-PCOS [$n = 37$]) were selected for this case-control study in the serum. Between 2018 and 2019, obese ($n = 19$) and normal weight ($n = 20$) women with or without PCOS who were receiving IVF treatment were included in the follicular fluid study. The bio-banked serums and follicular fluid were tested for total AMH (proAMH and AMH_{N,C} combined) and proAMH using an automatic analyzer. The AMH prohormone index (API = [proAMH]/[total AMH] × 100) was calculated as an inverse marker of conversion of proAMH to AMH_{N,C}, with only the latter isoform that could bind to the AMH receptor complex.

¹ Université de Lille, Inserm, CHU Lille, U1172 - LiNCog - Lille Neuroscience & Cognition, Lille F-59000, France

² AP-HP- Université Sorbonne Paris-Nord, Service de Médecine de la Reproduction et Préservation de la Fertilité, Hôpital Jean Verdier, Bondy F-93143, France

³ CHU Lille, Service de Gynécologie Médicale, Hôpital Jeanne de Flandre, Lille F-59000, France

⁴ CHU Lille, Service de Biochimie et Hormonologie, Centre de Biologie Pathologie, Lille F-59000, France

⁵ Department of Anatomy, School of Biomedical Sciences, University of Otago, Dunedin, New Zealand

⁶ Université de Lille, CHU Lille, ULR 2694 - METRICS: Évaluation des technologies de santé et des pratiques médicales, Lille F-59000, France

⁷ CHU Lille, Department of Biostatistics, F-59000 Lille, France HU Lille, Unité de Méthodologie - Biostatistique et Data Management, Lille F-59000, France

[†]Contributed equally.

KEYWORDS

AMH
BMI
Follicular fluid
Molecular forms
Obesity
PCOS

© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of Reproductive Healthcare Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

*Corresponding author. E-mail addresses: maeliiss.peigne@inserm.fr (M. Peigné), paolo.giacobini@inserm.fr (P. Giacobini).

<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.07.020> 1472-6483/© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of Reproductive Healthcare Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Declaration: This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), France (grant number U1172), by the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (ERC-2016-CoG to P.G. grant agreement number 725149/REPRODAMH), by the Centre Hospitalier Régional Universitaire, CHU de Lille, France (Bonus H to Paolo Giacobini). The authors report no financial or commercial conflicts of interest.

The serum proAMH/totalAMH ratio is linked to metabolic status but not to Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) per se

M. Peigné^{1,2,3,*}, P. Pigny^{1,3,4}, D. Dewailly^{1,3,5}, P. Giacobini¹, S. Catteau-Jonard^{1,3,5}

¹Inserm, UMR-S 1172, Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Lille, France, ²AP-HP, Unité de Médecine de la Reproduction, Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France, ³Université de Lille, ⁴CHU Lille, Service de Biochimie et Hormonologie, Centre de Biologie Pathologie, Lille, France, ⁵CHU Lille, Service de Gynécologie-Endocrinienne et Médecine de la Reproduction, Hôpital Jeanne de Flandre, Lille, France *maeliss.peigne@aphp.fr

Study Question

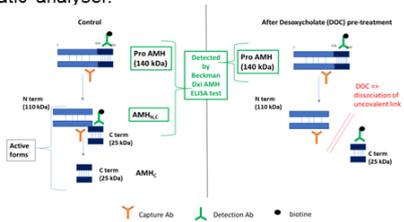
Is the ratio of circulating inactive AMH form (proAMH/totalAMH) decreased in PCOS women, implicating more active AMH forms in their serum ?

Introduction

- ✓ Anti-mullerian hormone (AMH) inhibits initial and cyclic follicular recruitment
- ✓ Compared to controls, serum AMH level is higher in women with PCOS and is supposed to act in the follicular arrest
- ✓ Different molecular forms of AMH exist: one inactive (proAMH) and two active which can bind the AMHRII receptor and induce AMH specific actions.
- ✓ The active forms are obtained after proAMH cleavage: AMH_C (C-term domain) and AMH_{N,C} (non-covalent association of N-term and C-term domains).
- ✓ Different AMH forms ratio are described in different populations.

Material and Methods

- ✓ 71 PCOS women (Rotterdam criteria) (42 obese and 29 lean) and 37 controls (16 obese and 21 lean) were selected.
- ✓ A specific assay for serum proAMH measurement was built on Beckman Dxi Automatic analyzer based on Pankhurst et al. experiments ¹
- ✓ Because Beckman Dxi Automatic analyzer is not able to detect AMH_C, the molecular AMH forms detected in the serum by Beckman Dxi Automatic analyzer are proAMH and AMH_{N,C} (= total AMH)
- ✓ Desoxycholate treatment leads to dissociation of the non-covalent link of AMH_{N,C}. N-term and C-term parts which prevents binding of the detection antibody. ProAMH is unaffected by the treatment as the molecule is uncleaved. After DOC treatment, only proAMH is detected by Beckman Dxi Automatic analyser.



- ✓ Relative levels of pro AMH were expressed as a proAMH ratio: [proAMH]/[totalAMH]x100.

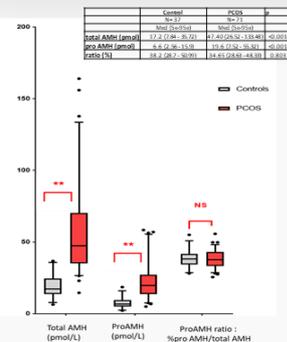


Fig 1 : Levels of AMH molecular forms in PCOS and control women

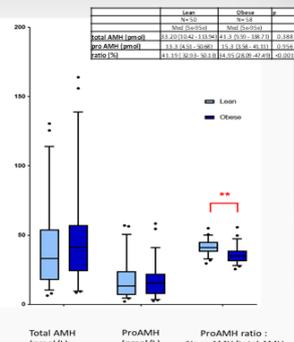


Fig 2 : Levels of AMH molecular forms in obese and lean women

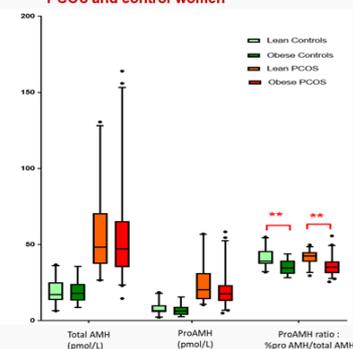


Fig 3 : Levels of AMH molecular forms in obese and lean control and PCOS women

Table 1: Population

| | Control | | PCOS | |
|--------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| | Lean (LC) N=21 | Obese (OC) N=16 | Lean (LP) N=29 | Obese (OP) N=42 |
| Age (y) | 32 (22.4-38) c,d | 31.5 (25-35.3) c | 23 (16.5-33) a,b | 27 (19.1-38.0) a |
| Weight (kg) | 59 (47.1-65.4) b,d | 94.25 (81.0-129) a,c | 55.7 (44.5-72.5) b,d | 91.0 (74.0-123.5) a,c |
| BMI (kg/m ²) | 20.7 (16.4-24.8) b,d | 33.75 (29.0-43.85) a,c | 20.2 (17.2-24.6) b,d | 34.05 (30.0-42.9) a,c |
| Waist Circumference (cm) | 72 (58.5-78.5) b,d | 103.5 (79.5-133) a,c | 75 (63-100) b,d | 107.0 (95.1-129.5) a,c |
| Waist/Hip Ratio | 0.75 (0.64-0.88) b,c,d | 0.84 (0.67-0.98) a,d | 0.84 (0.68-1.06) a,d | 0.91 (0.79-1.04) a,b,c |
| Testosterone (ng/ml) | 0.22 (0.13-0.41) c,d | 0.31 (0.16-0.41) d | 0.38 (0.17-0.63) a | 0.45 (0.21-0.88) a,b |
| Androstenedione (ng/ml) | 0.94 (0.5-1.58) b,d | 0.77 (0.42-1.72) c,d | 1.3 (0.74-2.87) a,b | 1.43 (0.64-3.04) a,b |
| Estradiol (pg/ml) | 36.0 (18.8-67.6) | 34.0 (17.0-60.5) | 34.0 (16.5-98.0) | 42 (28.1-81.2) |
| LH (IU/L) | 4.1 (1.93-12.7) | 3.05 (1.5-5.5) c,d | 5.8 (2.4-17.1) b | 5.2 (3.2-11.7) b |
| FSH (IU/L) | 5.5 (3.5-10.2) | 5.35 (4-7.67) | 5.1 (2.9-7.1) | 5.0 (3.2-8.2) |
| SBP (pmol/L) | 70.4 (40.7-103.8) b,c,d | 36.3 (17.2-65.75) a | 46.9 (25.1-96.1) a,d | 28.8 (10.1-64.2) a,c |
| Glycaemia (g/L) | 0.77 (0.71-0.99) | 0.86 (0.7-0.99) | 0.81 (0.69-0.95) | 0.85 (0.72-1.13) a |
| Insulinemia (mIU/L) | 3.4 (0.9-13.0) d | 5.6 (2.5-12.22) d | 4.6 (2.0-12.45) d | 11.6 (3.1-24.5) a,b,c |
| Total cholesterol (g/L) | 1.8 (1.1-2.4) | 1.66 (1.29-2.36) | 1.73 (1.20-2.59) | 1.89 (1.46-2.65) |
| HDL cholesterol (g/L) | 0.58 (0.38-0.77) b,d | 0.48 (0.32-0.61) a | 0.56 (0.37-0.77) d | 0.45 (0.29-0.58) a,c |
| LDL cholesterol (g/L) | 1.03 (0.57-1.58) | 1.06 (0.66-1.59) | 0.98 (0.59-1.74) | 1.26 (0.78-1.81) |
| Triglycerides (g/L) | 0.59 (0.36-1.42) d | 0.86 (0.44-1.65) | 0.65 (0.33-1.63) d | 1.1 (0.58-2.98) a,c |
| total AFC both ovaries | 22 (8.5-35) c,d | 21 (6-30.1) c,d | 52 (14.6-121.7) a,b | 55 (24.3-99.0) a,b |

- ✓ ProAMH/totalAMH ratio is not different between PCOS and control women
- ✓ It is decreased in obese versus lean women in the whole group and in PCOS and control women groups individually
- ✓ It is negatively correlated (Spearman) to metabolic parameters (Weight, BMI, Waist circumference, Insulinemia, Triglycerids)

Conclusion

- ✓ Serum ratio of AMH inactive form (proAMH/totalAMH) is not significantly different between PCOS and control women but is decreased in obese women versus controls.
- ✓ Metabolic status may have an impact on proAMH cleavage enzymes leading to an increased rate of circulating active AMH forms in obese women (with or without PCOS). Further studies on larger populations are required to study whether they may contribute to ovulation disorders in PCOS women and control obese women.

1, Pankhurst MW, McLennan IS. A specific immunoassay for proAMH, the uncleaved propeptide precursor of anti-Müllerian hormone. Mol Cell Endocrinol 2016;419:165-171

Annexe 3 : Comité de Protection des Personnes complet pour l'étude HERITOPK



Promotion CHRU de Lille – Document Confidentiel

Héritabilité du Syndrome des Ovaires Polykystiques : rôle de l'hormone antimüllérienne, des stéroïdes et de la leptine

HERITOPK

| | |
|---|--|
| N° de code attribué par le promoteur | 2017_11 |
| N° ID-RCB ou EudraCT | 2017-A02628-45 |
| Recherche Impliquant la Personne Humaine (RIPH) | Recherche de catégorie 2 : Recherche Interventionnelle à risque minime |
| Investigateur Principal | Pr Catteau-Jonard Sophie, PU-PH Service de gynécologie endocrinienne et médecine de la reproduction – Jeanne de Flandre, CHRU Lille Avenue Eugene Avinée, Tel: 03 20 44 63 09 Mail : sophie.jonard@chru-lille.fr |
| Promoteur | Centre Hospitalier Régional & Universitaire de Lille Département de la Recherche en Santé (DRS) 6 rue Pr Laguesse 59037 LILLE Cedex tél : 03 20 44 59 69 |
| Méthodologiste | Pr Alain Duhamel Plateforme d'aide méthodologique (Centre d'Etudes et de Recherche en Informatique Médicale) - E.A. 2694 Université de Lille 2. Faculté de Médecine – Pôle recherche 59045 LILLE Cedex Tél : 03.20.44.60.59. Mail : alain.duhamel@chru-lille.fr |
| Financier + N° de projet | |
| Number Clinical Trial (NCT) | |
| N° Version en cours/ Date : | Version n° 1.0 du 23/10/2017 |

HISTORIQUE DES MISES A JOUR DU PROTOCOLE

| VERSION | DATE | RAISON(S) DE LA MODIFICATION |
|---------|------|------------------------------|
| | | |
| | | |
| | | |



LISTE DES CENTRES RECRUTEURS

| N° CENTRE | SITE | INVESTIGATEUR PRINCIPAL |
|-----------|---|--------------------------|
| 1 | Service de gynécologie endocrinienne et médecine de la reproduction – Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille | Pr Catteau-Jonard Sophie |
| | | |
| | | |
| | | |

LISTE DES CENTRES TECHNIQUES PARTICIPANTS

| N° CENTRE | SITE | RESPONSABLE SCIENTIFIQUE OU MEDICAL |
|-----------|---|--|
| 1 | LABORATOIRE D'HORMONOLOGIE DU CBP | Pr Pigny Pascal |
| | INSERM 1172 | Dr Peigné Maëliiss Dr Giacobini Paolo Dr Prevost Vincent |
| | Service de gynécologie endocrinienne et médecine de la reproduction – Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille | Pr Dewailly Didier (Chef de service) |

LISTE DES CO-INVESTIGATEURS

| N° CENTRE | SITE | CO-INVESTIGATEUR |
|-----------|---|-------------------|
| 1 | Service de gynécologie endocrinienne et médecine de la reproduction – Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille | Dr Robin Geoffroy |
| | | |
| | | |
| | | |

Annexe 4 : Lettre d'information des patientes pour l'étude HERITOPK

« Héritabilité du Syndrome des Ovaires Polykystiques : rôle de l'hormone antimüllérienne, des stéroïdes et de la leptine »

Etude HERITOPK

Promoteur : CHRU de Lille

Investigateur principal : Pr Sophie CATTEAU-JONARD

Service de gynécologie endocrinienne et médecine de la reproduction

Jeanne de Flandre, CHRU Lille,

Tél : 03.20.44.63.09

Madame,

Le présent document décrit l'étude à laquelle il vous est proposé de participer. Il résume les informations actuellement disponibles en répondant aux différentes questions que vous pouvez vous poser dans le cadre de votre participation à cette recherche.

1) Pourquoi me propose-t-on de participer à cette étude ?

Vous avez été suivie dans notre service pour une infertilité et vous êtes actuellement enceinte. Lors de votre bilan initial des dosages hormonaux ont été réalisés : soit vous êtes porteuse d'un syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) soit votre bilan était normal. Nous souhaitons suivre l'évolution de vos hormones pendant la grossesse et réaliser des prélèvements pour dosages sur le placenta après l'accouchement. Aucun dosage ne sera réalisé chez votre enfant.

2) Quel est l'objectif de la recherche ?

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) est une pathologie fréquente dans la population féminine à l'origine de troubles de l'ovulation pouvant conduire à une infertilité. Il est décrit que les filles de femmes avec SOPK ont plus de risque de développer à leur tour un SOPK. Pourtant le mécanisme de transmission n'est pas connu. Nous vous proposons de participer à notre étude qui cherche à comprendre le rôle de différentes hormones dans cette transmission.

3) Comment va se dérouler la recherche ?

Au cours du suivi normal de votre grossesse, nous prélèverons des tubes de sang supplémentaires lors d'une prise de sang de suivi de grossesse. Seul le premier prélèvement sera réalisé à jeun, comme habituellement pour la prise de sang du 1^{er} trimestre.

Ces tubes supplémentaires seront prélevés à chaque trimestre de la grossesse. Il s'agit de 4 tubes de 7 ml au 1^{er} trimestre puis 3 tubes de 7 ml au 2^{ème} et 3^{ème} trimestre. Après l'accouchement une biopsie du placenta sera également réalisée.

Aucune prise de sang supplémentaire ne sera faite pendant votre grossesse, il s'agit juste de la récupération de tubes supplémentaires lors de prises de sang habituelles de suivi.

- Parmi ces 3 ou 4 tubes, 1 tube de 7 ml sera conservé à chaque fois au Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHRU de Lille pour la réalisation de dosages complémentaires pendant une durée de 10 ans.
- Le prélèvement de placenta sera également conservé au Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHRU de Lille pendant une durée de 10 ans.

Le recueil de votre consentement pour la constitution de ces deux collections biologiques sera nécessaire.

4) Que se passera-t-il à la fin de ma participation à cette recherche ?

Nous allons comparer les résultats de ces différents dosages hormonaux entre des patientes porteuses d'un SOPK et des patientes non atteintes. Le suivi de votre grossesse et de votre accouchement ne s'en verront aucunement modifié.

La collection d'échantillons biologiques constituée à partir de vos prélèvements sera conservée au niveau du Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHRU de Lille.

5) Quels sont les bénéfices attendus ?

Votre suivi de grossesse ne sera aucunement modifié. Cette étude nous permettra de connaître l'évolution de différentes hormones au cours de la grossesse et de savoir si celles-ci sont modifiées chez les patientes atteintes d'un SOPK par rapport à des patientes non atteintes. Nous pourrions également connaître également s'il existe des modifications hormonales dans le placenta de femmes avec SOPK par rapport à des placentas de patientes non atteintes.

6) La recherche comporte-t-elle des risques, des effets indésirables et/ou des contraintes particulières ?

Puisqu'il n'existe aucune intervention propre à cette étude, aucun risque, effet indésirable ou contrainte particulière n'est à déclarer.

7) Existe-t-il des alternatives au traitement/à la prise en charge ?

Non, la prise en charge reste identique que vous participiez ou non à cette étude.

8) Quelles sont les conditions de participation à la recherche ?

Afin de pouvoir participer à cette étude, vous devez être affilié(e) à un régime obligatoire d'Assurance Maladie ou ayant droit d'un assuré social.

Si vous acceptez de participer à cette étude, vous ne pourrez pas être le sujet d'une autre étude interventionnelle pendant toute la durée de votre participation à la recherche.

Votre participation à cette étude nécessite que nous informions votre médecin traitant, sauf si vous le refusez.

9) Quels sont mes droits en tant que participant à la recherche ?

Vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette recherche sans avoir à vous justifier et sans que cela ne modifie la relation de soin existant avec l'équipe médicale vous prenant en charge.

Vous n'êtes pas obligé de nous donner votre décision tout de suite ; vous disposez du temps que vous estimez nécessaire pour prendre votre décision. En cas d'acceptation, vous pourrez à tout moment revenir sur votre décision, sans nous en préciser la raison, et sans que cela n'altère la qualité des soins qui vous sont dispensés.

Par ailleurs, vous pourrez obtenir, au cours ou à l'issue de la recherche, communication de vos données de santé détenues par votre médecin.

Dans le cadre de la recherche, un traitement de vos données personnelles sera mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de l'étude au regard de l'objectif de cette dernière qui vous a été présenté. A cette fin, les données médicales vous concernant ou tout autre type de données existantes seront transmises au Promoteur de la recherche ou aux personnes ou société agissant pour son compte en France ou à l'étranger. Ces données seront identifiées par un numéro de code et vos initiales. Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé françaises.

Conformément aux dispositions de la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la

transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Ces droits s'exercent auprès du médecin qui vous a proposé de participer à cette étude.

Vous n'aurez à supporter aucune charge financière supplémentaire du fait de votre participation à cette étude.

10) Le CHRU de Lille est-il autorisé à réaliser ce type de recherche ?

Oui, en application de la loi, cette étude a reçu le 05/03/2018 un avis favorable du Comité de Protection des Personnes Ile de France X, organisme officiel et indépendant qui a notamment vocation à protéger la sécurité des personnes qui se prêtent à la recherche.

En outre, le CHRU de Lille, en sa qualité de promoteur, a souscrit une assurance pour la réalisation de cette étude. (SHAM 144.893)

11) A qui dois-je m'adresser en cas de questions ou de problèmes ?

Vous pouvez poser toutes les questions que vous souhaitez, avant, pendant et après l'étude en vous adressant à l'investigateur principal de l'étude : le Pr Sophie CATTEAU-JONARD au 03 20 44 63 09

Nous vous remercions de parapher chaque page de ce document (réalisé en trois exemplaires), afin d'attester que vous l'avez lu et compris. Si vous êtes d'accord pour participer à cette étude, nous vous remercions également de bien vouloir donner votre consentement écrit en signant le formulaire ci-après.

Annexe 5 : Consentement pour l'étude HERITOPK

« Héritabilité du Syndrome des Ovaires Polykystiques : rôle de l'hormone antimüllérienne, des stéroïdes et de la leptine »

Etude HERITOPK

Promoteur : CHRU de Lille

Investigateur principal : Pr Sophie CATTEAU-JONARD

Service de gynécologie endocrinienne et médecine de la reproduction

Jeanne de Flandre, CHRU Lille,

Tél : 03.20.44.63.09

Je soussignée Mme

accepte librement et volontairement de participer à la recherche biomédicale intitulée :

« Héritabilité du Syndrome des Ovaires Polykystiques : rôle de l'AMH, des stéroïdes et de la leptine »

dont le CHRU de Lille est promoteur et qui m'a été proposée par le Professeur (Nom, coordonnées)
.....

Etant entendu que :

- Le médecin qui m'a informée et a répondu à toutes mes questions, m'a précisé que ma participation à cette étude est libre et que je peux arrêter d'y participer à tout moment en informant préalablement mon médecin.
- J'ai été clairement informée des éléments suivants : But de la Recherche- Méthodologie- Durée de ma participation- Bénéfices attendus- Contraintes- Risques prévisibles.
- J'ai bien compris que pour pouvoir participer à cette recherche, je dois être affilié(e) à un régime de sécurité sociale ou être ayant-droit d'un assuré social. Je confirme que c'est bien le cas,
- Si je le souhaite, je serai informée par le médecin des résultats globaux de cette recherche selon les modalités figurant dans la note d'information qui m'a été remise,
- Mon consentement ne décharge en rien le médecin et le promoteur de l'ensemble de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

La collection d'échantillons biologiques constituée à partir de vos prélèvements sera conservée au sein du Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHRU de Lille sous la responsabilité de M. P. Gelé.

Cette collection biologique pourra être réutilisée pour d'autres analyses complémentaires afin d'étudier d'autres marqueurs hormonaux sauf si vous exprimez votre opposition à l'utilisation ultérieure de vos prélèvements. A tout moment, vous pouvez vous opposer à la réutilisation de vos échantillons à des fins scientifiques ultérieures en adressant une copie de ce document, après avoir coché la case ci-dessous, à M.....à l'adresse suivante :

En cochant cette case, j'exprime mon accord concernant la réutilisation à des fins scientifiques secondaires de mes prélèvements biologiques.

OU

A l'issue de l'étude, mes prélèvements biologiques utilisés dans le cadre de la recherche seront détruits

Fait à, le.....

Signature du participant

Fait à, le.....

Signature du médecin investigateur

Le présent formulaire est réalisé en trois exemplaires, dont un est remis à l'intéressé, ou à son représentant légal. Un exemplaire sera conservé par l'investigateur ; le dernier sera conservé par le promoteur en toute confidentialité, conformément à la loi.

Résumé

CONTEXTE : Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), qui touche 5 à 20 % des femmes, est caractérisé par une hyperandrogénie, des troubles de l'ovulation ou un aspect échographique d'ovaires polykystiques. L'hormone anti-müllérienne (AMH), dont le taux sérique est 2-3 fois plus élevé chez les femmes avec SOPK que chez les témoins, a pour rôle l'inhibition du recrutement folliculaire initial et cyclique et pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de ce syndrome. Elle existe sous différentes formes moléculaires, clivée et non-clivée. L'injection d'AMH chez la souris en fin de gestation provoque, dans la descendance, l'apparition d'un phénotype « SOPK » possiblement via une hyperandrogénie gestationnelle. L'AMH pourrait donc, également, jouer un rôle dans l'héritabilité du SOPK qui est estimée entre 35 et 70%, mais n'est expliquée que dans moins de 10% des cas par une cause génétique.

PARTIE 1 : Dans la première partie, nous nous sommes intéressés à la proportion des différentes formes moléculaires de l'AMH dans le sérum et dans le liquide folliculaire des femmes en fonction de la présence ou non d'un SOPK et de l'indice de masse corporelle. Après un prétraitement de l'échantillon par déoxycholate (DOC), seule la forme non-clivée, inactive, de l'AMH était dosable. Ainsi, par comparaison des mesures d'AMH avec ou sans prétraitement par DOC, nous avons obtenu la proportion des formes moléculaires clivées et non-clivées de l'AMH. Cette proportion n'est pas différente entre les femmes atteintes d'un SOPK et les femmes témoins. En revanche, la proportion de formes clivées est plus élevée dans le sérum de femmes obèses par rapport aux femmes de poids normal, alors qu'elle n'est pas différente dans le liquide folliculaire. Ainsi, nous avons pu montrer que le clivage de la forme inactive de l'AMH, en sa forme clivée active, semble survenir plutôt en dehors de l'ovaire et est majoré chez les patientes obèses.

PARTIE 2 : Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons exploré, chez la femme, l'impact possible de l'AMH pendant la grossesse sur l'héritabilité du SOPK. Nous avons réalisé un suivi longitudinal trimestriel de femmes enceintes porteuses ou non d'un SOPK. Nous avons mis en évidence que le taux d'AMH, et de sa forme clivée, diminuaient significativement pendant la grossesse mais restaient plus élevés chez les femmes avec SOPK que chez les témoins. En revanche la proportion de ces différentes formes moléculaires n'était pas modifiée pendant la grossesse. Une hyperandrogénie gestationnelle est retrouvée chez les femmes avec SOPK mais nécessite d'être confirmée par des dosages complémentaires. A la différence de ce qui a été montré chez la souris, le taux de LH chez les femmes avec SOPK n'est pas plus élevé que chez les témoins en fin de grossesse. Enfin, les analyses d'expressions géniques placentaires ne sont que parcellaires mais l'expression des gènes de la stéroïdogénèse et de l'AMHR2 est bien retrouvée, sans différence significative entre femmes avec SOPK et femmes témoins, pour le moment.

CONCLUSION : Ce travail a permis de mettre en évidence que le lien entre AMH et SOPK, cette pathologie hétérogène, est complexe. L'AMH, par la modulation de ses formes actives circulantes en fonction de l'environnement métabolique, pourrait avoir des impacts différents selon les phénotypes métaboliques des patientes. En particulier pendant la grossesse, l'AMH pourrait participer, peut-être de façon différente en fonction des phénotypes métaboliques des patientes, à moduler un état d'hyperandrogénie gestationnelle possiblement à l'origine de modifications d'expressions géniques ou épigénétiques pendant le développement fœtal à l'origine d'une prédisposition au développement ultérieur du SOPK.