

**VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2018 - Thèse n°124

***DEVELOPPEMENT D'UN IMMUNODOSAGE DE L'HORMONE
ANTI-MÜLLERIENNE CHEZ LES BOVINS
EXPLOITATION D'UN BIOMARQUEUR POUR EVALUER LES
PERFORMANCES DE REPRODUCTION***

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 20 Décembre 2018
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

BLANC Elodie



**VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2018 - Thèse n°124

***DEVELOPPEMENT D'UN IMMUNODOSAGE DE L'HORMONE
ANTI-MÜLLERIENNE CHEZ LES BOVINS
EXPLOITATION D'UN BIOMARQUEUR POUR EVALUER LES
PERFORMANCES DE REPRODUCTION***

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 20 Décembre 2018
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

BLANC Elodie



Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (1er mars 2018)

Nom	Prénom	Département	Grade
ABITBOL	Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ARCANGIOLI	Marie-Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
AYRAL	Florence	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BECKER	Claire	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BELLUCO	Sara	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENAMOU-SMITH	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENOIT	Etienne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BERNY	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BOULOCHER	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BOURDOISEAU	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
BOURGOIN	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BUFF	Samuel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BURONFOSSE	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
CACHON	Thibaut	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CADORÉ	Jean-Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
CAROZZO	Claude	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CHABANNE	Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CHALVET-MONFRAY	Karine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DE BOYER DES ROCHES	Alice	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DEMONT	Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
DJELOUADJI	Zorée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ESCRIOU	Catherine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
FRIKHA	Mohamed-Ridha	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GALIA	Wessam	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Stagiaire
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
GONTHIER	Alain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GRANCHER	Denis	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
GREZEL	Delphine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
HUGONNARD	Marine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
JANKOWIAK	Bernard	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Contractuel
JAUSSAUD	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
JEANNIN	Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Inspecteur en santé publique vétérinaire (ISPV)
JOSSON-SCHRAMME	Anne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences Contractuel
JUNOT	Stéphane	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
KODJO	Angeli	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
KRAFFT	Emilie	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
LAABERKI	Maria-Halima	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LAMBERT	Véronique	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LE GRAND	Dominique	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
LEBLOND	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LEDOUX	Dorothée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Stagiaire
LEFEBVRE	Sébastien	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences Stagiaire
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEPAGE	Olivier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LOUZIER	Vanessa	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
MARCHAL	Thierry	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MATEOS	Stevana	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
MOISSONNIER	Pierre	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOUNIER	Luc	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
PEPIN	Michel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
PIN	Didier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PONCE	Frédérique	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PORTIER	Karine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
POUZOT-NEVORET	Céline	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
PROUILLAC	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
REMY	Denise	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
RENE MARTELLET	Magalie	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
RIVES	Germain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Contractuel
ROGER	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
SABATIER	Philippe	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
SAWAYA	Serge	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
SCHRAMME	Michael	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
SERGENTET	Delphine	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
THIEBAULT	Jean-Jacques	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
THOMAS-CANCIAN	Aurélie	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
TORTEREAU	Antonin	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
VIGUIER	Eric	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
VIRIUX-WATRELOT	Dorothée	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
ZENNER	Lionel	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur

REMERCIEMENTS DU JURY

A Monsieur le Professeur René Ecochard,
De la faculté de médecine Claude Bernard Lyon I,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse,
Et pour l'intérêt manifesté à cet ouvrage,
Je vous présente mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Thierry BURONFOSSE,
Du campus vétérinaire de Lyon,
Qui a encadré et corrigé mon travail,
Pour son implication, son investissement et son soutien,
Un immense merci.

A Madame la Professeur Dominique LEGRAND
Du campus vétérinaire de Lyon,
Pour m'avoir accordé le privilège de faire partie du jury de cette thèse,
Pour l'attention portée à mon travail,
Pour le « prêt » de Polypocket et de ses autres protégées,
Merci.

TABLE DES MATIÈRES

Table des figures.....	11
Table des tableaux.....	13
Liste des abréviations.....	15
Introduction.....	17
Partie I : Etude bibliographique.....	19
I. Physiologie ovarienne de la vache	19
a. Anatomie de l'ovaire	19
b. Evolution des populations cellulaires ovariennes	20
c. Folliculogénèse.....	21
d. Notion de « vagues de croissance folliculaire ».....	22
e. Régulation hormonale	23
i. Recrutement, sélection et dominance	23
ii. Régulation de la croissance folliculaire.....	24
iii. Régulation hormonale du cycle ovarien	29
II. L'hormone anti-müllérienne, hormone indicatrice de la réserve ovarienne.....	32
a. Description	32
b. Sécrétion de l'hormone anti-müllérienne	33
i. Généralités	33
ii. Particularités chez le mâle.....	35
c. Rôles de l'hormone anti-müllérienne	35
i. Au cours de l'embryogénèse	35
ii. Au cours de la folliculogénèse	35
iii. Au cours de la stéroïdogénèse ovarienne	38
iv. Chez le mâle	38
d. Modulation et régulation de l'hormone anti-müllérienne chez la femelle	39
e. Cinétique de l'hormone anti-müllérienne plasmatique au cours de la vie chez les bovins	40
i. Avant la maturité sexuelle	40
ii. Au cours du cycle œstral	41
iii. Après la maturité sexuelle	42
iv. En réponse à un traitement de super-ovulation.....	42
v. Facteurs de variation de la cinétique.....	42
III. L'hormone anti-müllérienne, hormone prédictive du potentiel reproducteur ...	44
a. L'hormone anti-müllérienne, indicatrice du nombre de follicules antraux	44
i. Pool de follicules antraux et fertilité	44

ii.	Corrélation AMH nombre de follicules antraux	45
b.	Exploitation de l'AMH dans le cadre du transfert d'embryon	46
i.	Réponse aux traitements de super-ovulation	47
ii.	Production d'embryons viables	48
c.	Utilisation de l'AMH comme marqueur phénotypique du potentiel reproducteur	48
i.	Hormone anti-müllérienne et productivité	48
ii.	Héritabilité des paramètres de fertilité	50
d.	Exploitation de l'AMH dans le cadre de la fécondation <i>in vitro</i>	51
i.	Chez les vaches adultes cyclées	51
ii.	Chez les veaux	51
	Partie II : Etude expérimentale.....	53
I.	Objectifs	53
I.	Matériel et méthodes	54
a.	Animaux et protocoles de suivi	54
i.	Vaches adultes cyclées	54
ii.	Génisses Holstein prépubères.....	54
iii.	Influence du cycle ovarien chez des vaches adultes.....	55
b.	Dosages effectués.....	55
i.	Prélèvements de sang.....	55
ii.	Dosage de la progestérone plasmatique	55
iii.	Dosage de la concentration plasmatique en 17 β -œstradiol	55
iv.	Dosage de l'hormone anti-müllérienne.....	56
c.	Analyses des données	56
II.	Résultats	57
a.	Evolution de la concentration sérique en AMH chez des bovins adultes en fonction de l'âge	57
b.	Influence des facteurs de variation	60
i.	Influence du cycle ovarien	60
ii.	Influence de l'âge entre la naissance et un âge pré-pubère (200 jours)	62
III.	Discussion	64
	Conclusion.....	69
	Bibliographie.....	71

Table des figures

Figure 1 : Schéma d'une coupe médiale d'ovaire de vache	19
Figure 2 : Ovogénèse chez la vache	21
Figure 3 : Folliculogénèse.....	22
Figure 4 : Dynamique folliculaire chez la vache (inspiré de MARIANA et al., 1973).	23
Figure 5 : Schéma représentant le rôle de l'AMH, de la FSH et de l'inhibine sur la maturation folliculaire chez la vache	26
Figure 6 : Profil hormonal au cours du cycle sexuel de la vache	31
Figure 7 : Modélisation moléculaire de l'hormone anti-müllérienne humaine (source : "Austin IVF Cycles" 2014)	32
Figure 8 : Variation de la quantité en AMH dans les cellules de la granulosa pendant la maturation folliculaire et l'atrésie	33
Figure 9 : Immunomarquage montrant la localisation de l'expression de l'hormone anti-müllérienne au sein d'un ovaire de souris.....	34
Figure 10 : Nombre de follicules primordiaux et antraux chez des souris de génotype « sauvage » et des souris AMHKO (anti-müllérien hormone knockout) suivant l'âge des individus	36
Figure 11 : Variation du nombre de follicules au sein des ovaires en fonction de la concentration en FSH	37
Figure 12 : Schéma représentant le rôle de l'AMH, de la FSH et de l'inhibine sur la maturation folliculaire	38
Figure 13 : Effet <i>in vitro</i> de la FSH, du BMP4 et du BMP6 sur la sécrétion d'AMH par les cellules de la granulosa de follicules de 3 à 5 mm (a) et de 5 à 10 mm (b) de diamètre.....	39
Figure 14 : Variation de la concentration en AMH au cours de la première année de vie chez les jeunes bovins.....	41
Figure 15 : Corrélation entre la concentration en AMH et le nombre de follicules antraux.....	45
Figure 16 : Corrélation entre le nombre de follicules comptés et une valeur unique de la concentration plasmatique en AMH	46
Figure 17 : Longévité des vaches laitières au sein d'un troupeau selon leur concentration en AMH	49
Figure 18 : Corrélation entre la concentration en AMH et différents marqueurs d'efficacité de la fécondation <i>in vitro</i>	52
Figure 19 : Evolution de la concentration en hormone anti-Müllérienne chez les vaches Holstein âgées de plus de 17 mois (n = 120)	57
Figure 20 : Evolution de la concentration en hormone anti-Müllérienne chez les vaches Charolaises âgées de plus de 12 mois (n = 152)	58
Figure 21 : Représentation des concentrations cumulées d'AMH dans la Holstein (●) et la race Charolaise (■) en fonction de l'âge.....	59
Figure 22 : Comparaison des concentration en AMH des deux races étudiées	59
Figure 23 : Concentrations sériques en hormone anti-Müllérienne selon la tranche d'âge chez les vaches Holstein (●) et Charolaise (▼)	60
Figure 24 : Concentrations sériques en hormone anti-Müllérienne en fonction du cycle ovarien (n = 4)	61
Figure 25 : Concentrations sériques en hormone anti-Müllérienne en fonction de l'âge depuis la naissance jusqu'à un âge pré-pubère.....	62

Table des tableaux

<i>Tableau I : Actions paracrine exercées par les facteurs de croissance sur les cellules de la granulosa in vitro.....</i>	<i>27</i>
---	-----------

Liste des abréviations

AMH : hormone anti-mullérienne

AMHKO : AMH *knock out*

BMP : *bone morphogenetic protein*

FSH : *follicle stimulating hormone*

GnRH : *gonadotropine releasing hormone*

LH : *luteinizing hormone*

INTRODUCTION

En 1993, la production annuelle d'une vache laitière était de 5 036 L/an. En 2016, elle s'élève à 7 154 L/an. Nous pouvons ainsi voir qu'un des objectifs premiers de la sélection génétique a été de sélectionner des vaches de plus en plus performantes au niveau de la production laitière. Cependant, depuis quelques années, il a été mis en évidence que cette sélection intense sur un seul critère, a été défavorable à la conservation de bons critères de fertilité (PRYCE et VEERKAMP, 2001). On observe une augmentation de l'intervalle vêlage vèlage, des premières chaleurs plus tardives et des taux de fécondité plus bas. Or, si la production lactée est l'un des enjeux économiques majeurs des élevages laitiers, la baisse de fertilité des troupeaux entraîne une perte économique importante et non négligeable. Ainsi, les critères de sélection ont besoin d'être redéfinis (BERGLUND, 2008). Pour cela, de nombreuses études cherchent à mettre en évidence des paramètres évaluables facilement qui permettraient d'identifier rapidement les animaux avec le plus grand potentiel génétique (BERRY *et al.*, 2014).

En élevage allaitant, la fertilité des troupeaux est meilleure du fait des méthodes de sélection moins drastiques (BERRY *et al.*, 2014). Le produit principal en élevage allaitant est le veau. Or, pour avoir les meilleurs veaux possibles il peut être intéressant de sélectionner les meilleurs géniteurs. Les outils existants sont déjà assez performants mais les sélectionneurs sont toujours à la recherche de plus de garanties.

De plus, depuis une dizaine d'années, les techniques de fécondation *in vitro* et de transfert d'embryon se démocratisent (HASLER, 2014). Ces nouvelles techniques ont un coût non négligeable pour l'éleveur qui les entreprend : protocole de synchronisation, collecte des embryons, insémination des receveuses... Et tout cela sans garantie de résultats. Il semble donc plus qu'intéressant de rechercher des outils qui permettraient d'orienter les éleveurs vers les animaux pour lesquels, les résultats seront les meilleurs, limitant ainsi les dépenses « inutiles » (KÖNIG *et al.*, 2007).

L'hormone anti-müllérienne ou AMH, est connue depuis longtemps pour son action inhibitrice sur les canaux de Müller chez les fœtus mâles, découverte par Alfred Jost en 1947. Il s'agit d'une glycoprotéine dimérique de 140 kDa qui fait partie de la famille des TGF β (*Transforming Growth Factor β*). Son gène codant est localisé à l'extrémité du bras court du chromosome 19 (COHEN-HAGUENAUER *et al.*, 1987). La séquence du gène bovin et du gène humain sont homologues à 78% (CATE *et al.*, 1986). De nombreuses études ont été menées afin de déterminer son rôle précis, ses conditions d'expression et son implication dans la notion de fertilité chez la femme premièrement. Pendant très longtemps, elle a été référencée comme un marqueur fiable de la réserve ovarienne et de la réponse à un traitement de fécondité chez les femmes ayant des difficultés à procréer (TRAN *et al.*, 2011). Même si cette affirmation est aujourd'hui remise en cause, ses applications chez la femme ont donné des idées aux chercheurs qui ont voulu savoir s'il était possible de les extrapoler au domaine de la reproduction bovine.

Après la découverte de l'implication de l'hormone anti-müllérienne en tant qu'indicateur du nombre de follicules antraux présents chez les bovins femelles

(BATISTA *et al.*, 2014; FANCHIN *et al.*, 2003; JIMENEZ-KRASSEL *et al.*, 2015), de nombreuses études ont fleuris, cherchant à démontrer un lien entre cette hormone et les performances reproductrices. La difficulté de telles recherches porte principalement sur la taille des effectifs des études et sur la durée du suivi effectué. Plusieurs études s'accordent cependant à dire que la mesure de la concentration en AMH plasmatique d'une vache avant tout protocole de synchronisation, fécondation pourrait prédire sa réponse au dit traitement et donc le résultat potentiel (RICO *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2015; TONHATI *et al.*, 1999; VERNUNFT *et al.*, 2015).

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer la variation de la concentration de cette hormone au cours de la vie des bovins femelles cyclées ou prépubères, sur une échelle de temps plus ou moins longue. L'objectif étant de pouvoir déterminer à quel moment la mesure de la concentration plasmatique en AMH semble la plus appropriée, dans l'optique d'utiliser ce marqueur comme un indicateur de la vie reproductive future d'une vache donnée.

Dans une première partie, sont présentées les caractéristiques physiologiques de la reproduction chez la vache et les données actuelles sur l'hormone anti-müllérienne et ses éventuelles applications en élevage. Dans une seconde partie, sont présentés les résultats du travail réalisé avec les éléments de discussion qu'ils soulèvent.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Physiologie ovarienne de la vache

Au sein de l'ovaire, on distingue deux processus de développement étroitement imbriqués : l'ovogenèse et la folliculogénèse. Ces phénomènes déterminent le nombre et la qualité des ovocytes produits par l'ovaire. Ils sont initiés pendant la vie fœtale, se poursuivent pendant toute la vie de la femelle et sont étroitement contrôlés à chacune de leurs étapes par de nombreux facteurs hormonaux et environnementaux (MONNIAUX *et al.*, 2009).

a. Anatomie de l'ovaire

L'ovaire de la vache adulte a la forme d'une grosse amande, il est ellipsoïde à ovoïde, plus ou moins aplati d'un côté à l'autre, et mesure environ 4*2-3*2-3 cm. Il est appendu par le mésovarium au plafond lombaire. Le point de jonction entre ce mésovarium et l'ovaire s'appelle le hile de l'ovaire, lieu de passage de l'artère utéro-ovarienne, des veines utérines et de nerfs. Le hile est un lieu d'échange de nutriments et d'hormones entre l'ovaire et la circulation générale (BARONE, 2001).

On distingue sur une coupe d'ovaire les quatre couches cellulaires (de l'intérieur vers l'extérieur) :

- La médulla qui contient principalement un tissu conjonctif très vascularisé où persistent des restes de structures tubulaires mâles qui ont régressé pendant le développement embryonnaire.
- Le cortex profond, tissu conjonctif dans lequel sont insérées des glandes interstitielles.
- Le cortex superficiel, couche germinative qui contient des cellules germinales à différents stades.
- L'albuginée, couche fibreuse.
- L'épithélium germinatif qui contient les cellules germinales souches et les follicules primordiaux.

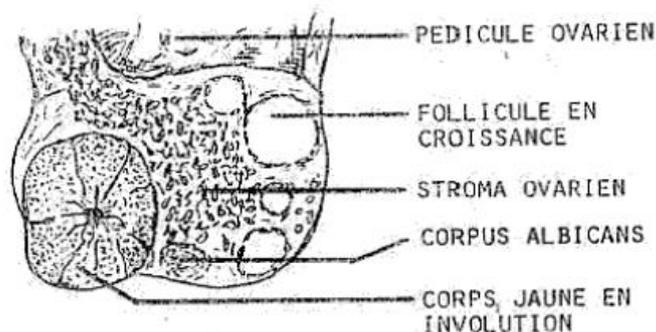


Figure 1 : Schéma d'une coupe médiale d'ovaire de vache
(source : BARONE, 2001)

Chez la vache, l'ovaire est évaluable par palpation transrectale. Il présente une surface plus ou moins bosselée selon le stade du cycle. En phase d'œstrus, la surface de l'ovaire est déformée par un ou plusieurs follicules pré ovulatoires (dits cellules de De Graaf), de consistance liquidienne au niveau de la paroi sous tension. En phase de métaœstrus, se développe un corps jaune qui présente une forme caractéristique en « bouchon de champagne » avec la cicatrice de l'ovulation à son sommet. En phase de diœstrus, le corps jaune évolue en un corps blanc beaucoup moins consistant.

b. Evolution des populations cellulaires ovariennes

Dès la naissance, et pendant toute la vie de la femelle, les follicules s'altèrent et leur nombre diminue : on parle d'appauvrissement du stock folliculaire, également appelé vieillissement ovarien. Il est commun à tous les mammifères. L'évolution des populations cellulaires ovariennes est variable selon les individus, l'âge ainsi que leur statut physiologique.

La différenciation sexuelle embryonnaire est établie vers la 6^{ème} semaine de la gestation chez la vache. Durant cette période fœtale, les cellules germinales primordiales colonisent la crête génitale. Elles donnent, après différenciation naissance aux ovogonies. Ces ovogonies se multiplient de façon mitotique dans les cordons ovigères jusqu'à leur entrée en prophase méiotique qui marque l'arrêt de leur accroissement numérique (MONNIAUX *et al.*, 2009). Cette multiplication s'étend du 60^{ème} au 170^{ème} jour du développement embryonnaire et fœtal (ERICKSON, 1966). Les ovaires peuvent contenir alors jusqu'à 2 millions d'ovogonies (HANZEN *et al.*, 2000) durant la vie fœtale.

La phase mitotique terminée, ces dernières entament le processus de méiose qui s'interrompt au stade diplotène (dit aussi vésicule germinale) de la prophase I et deviennent ainsi des ovocytes I. Chaque ovocyte s'entoure d'une couche de cellules somatiques, de cellules de la granulosa et d'une lame basale pour former des follicules primordiaux (DRION *et al.*, 1996, MONNIAUX *et al.*, 2009).

À la puberté, plusieurs ovocytes I sont activés, un seul est « sélectionné » pour poursuivre la première division de la méiose I. Une fois la première division méiotique terminée, l'ovocyte I donne deux cellules haploïdes de volume très inégal. La plus petite des cellules est appelée globule polaire I et la plus grosse, qui contient tout le cytoplasme l'ovocyte II. Cet ovocyte II commence la seconde division de la méiose mais ne la termine pas. Il reste bloqué en métaphase II jusqu'à la libération de l'œuf mature. C'est lors de la fécondation ou de l'activation parthénogénétique de l'œuf que la méiose se termine.

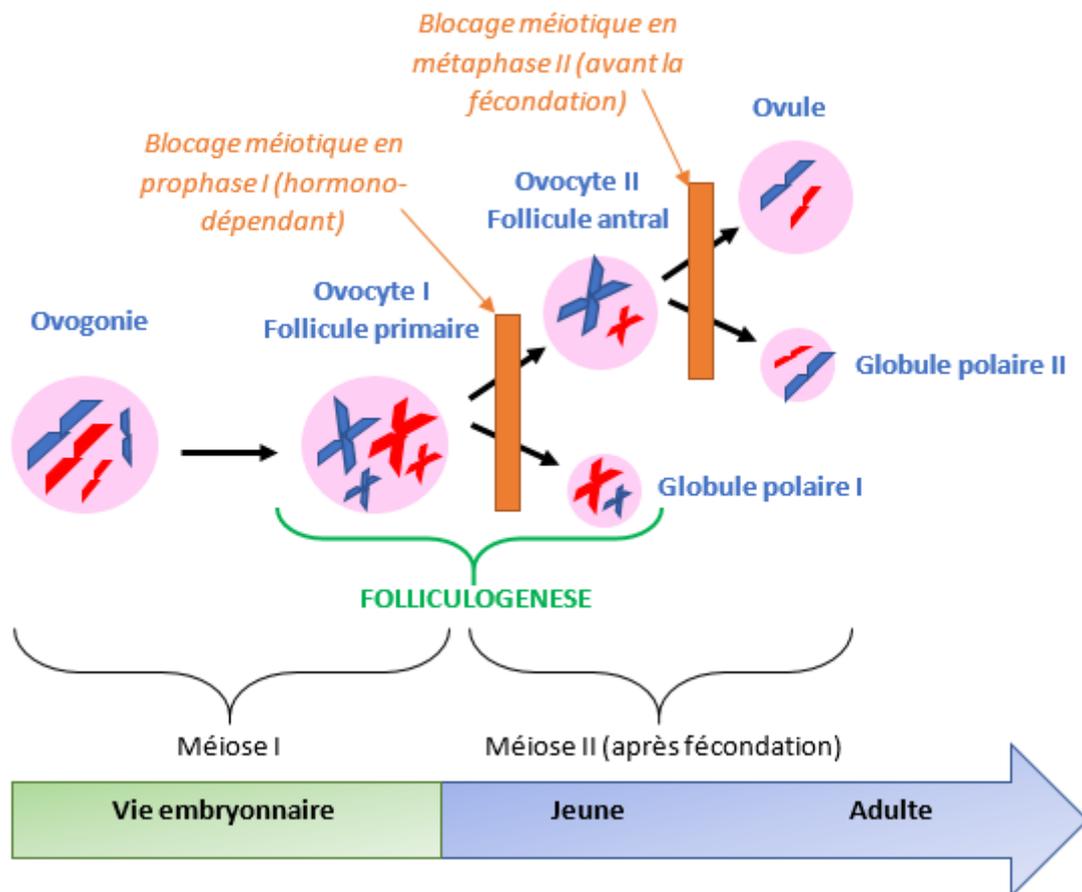


Figure 2 : Ovogénèse chez la vache

c. Folliculogénèse

La folliculogénèse regroupe l'ensemble des phénomènes qui assurent la croissance et la maturation des follicules. Elle débute pendant le développement fœtal. En effet, les follicules antraux sont observés dans les ovaires des fœtus bovins très tôt, dès 5 mois de gestation (SANTOS *et al.*, 2013).

Il s'agit d'un processus continu initié à partir de la réserve de follicules primordiaux jusqu'à l'ovulation ou, cas le plus fréquent (99% des follicules en croissance), à l'atrésie (MONNIAUX *et al.*, 2009; THIBAUT et LEVASSEUR, 2001).

L'initiation de la croissance folliculaire se caractérise par l'augmentation du volume de l'ovocyte et l'entrée en prolifération des cellules de la granulosa (MONNIAUX *et al.*, 2009). Cette phase ne concerne que 10 % du stock folliculaire qui est de 150 000 à 235 000 chez la vache (HANZEN *et al.*, 2000). Elle est caractérisée par des modifications qui concernent à la fois le follicule et l'ovocyte qu'il renferme (MONNIAUX *et al.*, 2009).

La maturation des follicules est très progressive et s'accompagne de leur migration vers le cortex profond. Des cellules musculaires lisses de la médulla et de l'albuginée favorisent la migration des follicules arrivés à maturation.

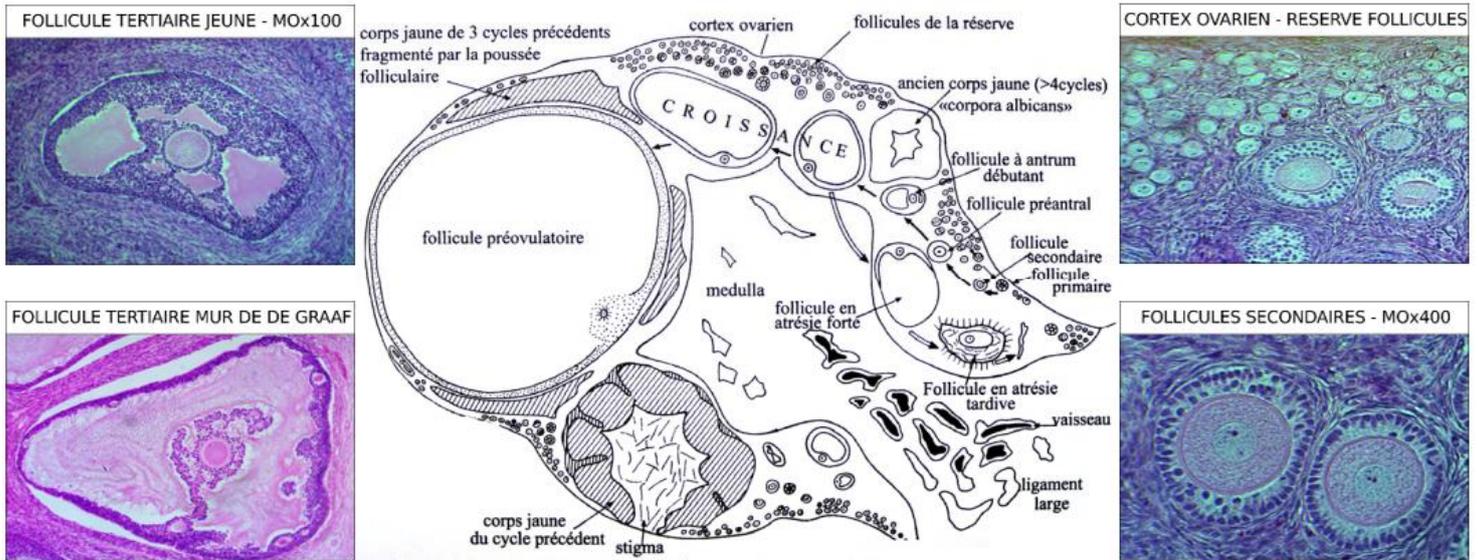


Figure 3 : Folliculogénèse
(source : DRIANCOURT, 2001)

d. Notion de « vagues de croissance folliculaire »

La population des follicules ovulatoires se renouvelle au cours du cycle ovarien par une succession de croissance ou de régression folliculaires successives (GINTHER et HOFFMAN, 2014; SARTORI et BARROS, 2011) appelées « vagues folliculaires ».

Une vague folliculaire correspond à la croissance synchrone d'une cohorte de follicules, suivie de la sélection d'un ou de plusieurs follicules qualifiés de follicules dominants et de leur évolution vers l'ovulation, ou de leur régression successive quand les conditions endocriniennes sont défavorables.

Au cours de la période pré-pubertaire, la croissance folliculaire se déroule déjà sous forme de vagues ; cependant, tous les follicules sont anovulatoires à cause d'une insuffisance de l'hormone LH (SAVIO *et al.*, 1988). Des études ont également montré l'émergence des vagues de croissance folliculaire pendant la gestation mais sans phénomènes de sélection ni de dominance (GINTHER *et al.*, 1989).

Chez la vache adulte cyclée, un cycle comporte le plus souvent 2, voire 3 vagues apparaissant respectivement aux jours 2 et 11 ou aux jours 2, 9 et 16 du cycle. Au cours de chaque vague, on assiste à l'émergence de plusieurs follicules de diamètre supérieur ou égal à 4 mm, parmi lesquels apparaîtra le follicule pré-ovulatoire issu de la dernière vague (GINTHER *et al.*, 2013).

e. Régulation hormonale

i. *Recrutement, sélection et dominance*

Chaque vague de croissance folliculaire se décompose en trois phases : recrutement, sélection et dominance.

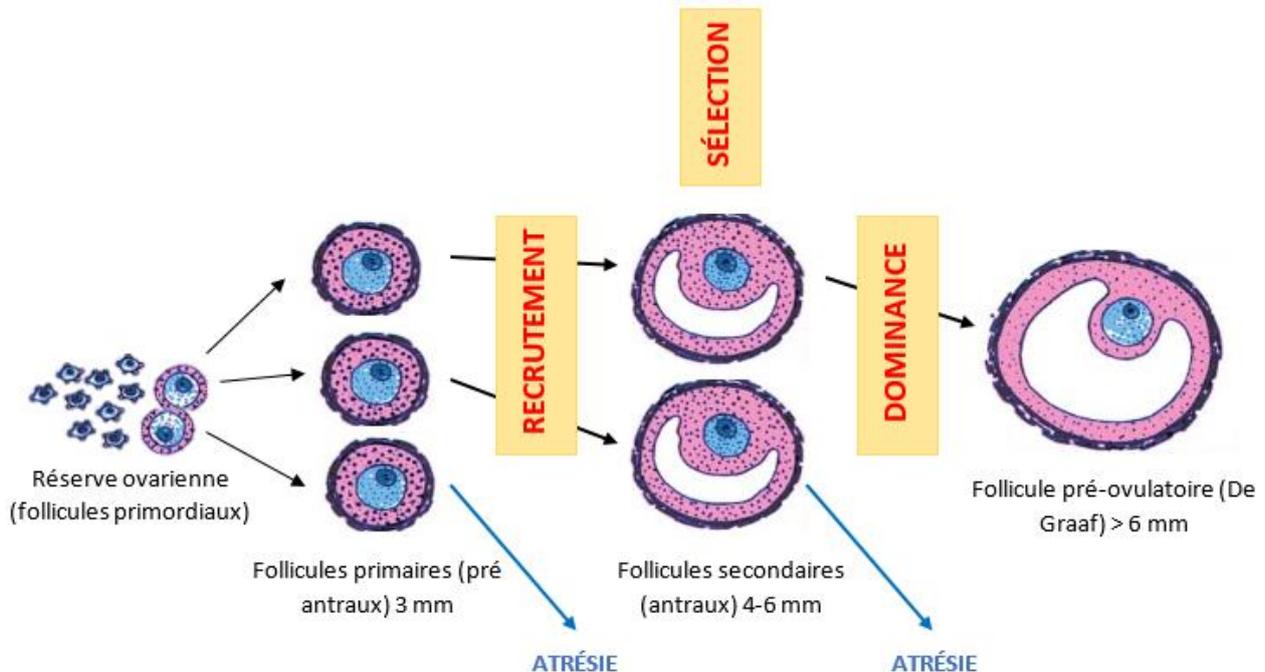


Figure 4 : Dynamique folliculaire chez la vache (inspiré de MARIANA et al., 1973)

Lors de la phase de recrutement, 2 à 3 follicules primaires de diamètre compris entre 3 et 6 mm deviennent réceptifs à la FSH et débutent leur maturation.

La phase de sélection correspond à l'émergence du ou (des) follicule(s) ovulatoire(s) parmi les follicules recrutés. Ceux-ci commencent à sécréter des œstrogènes et de l'inhibine. Ces hormones exercent un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse, abaissant ainsi la sécrétion de la FSH à un niveau inférieur aux besoins folliculaires. À l'exception du ou (des) follicule(s) sélectionné(s) capable(s) de se développer en présence d'un faible taux de FSH, les autres follicules entrent en atrophie.

Pendant la dernière phase, appelé phase de dominance, un des follicules acquiert les récepteurs de LH dans ses cellules de la granulosa et devient dominant (MONNIAUX *et al.*, 2009). La dominance est à la fois morphologique et fonctionnelle. Elle est qualifiée de morphologique parce qu'elle est exercée par le plus gros follicule présent sur l'un ou l'autre ovaire. Elle est également fonctionnelle parce que le follicule dominant est le seul qui soit capable de provoquer la régression des follicules en croissance, d'inhiber le recrutement de nouveaux follicules (SIROIS et FORTUNE, 1988) et d'ovuler dans un environnement hormonal approprié. Le follicule dominant cohabite sur le même ovaire avec 2 à 4 follicules de diamètre compris entre 4 et 8 mm et environ 20 à 80 autres follicules de diamètre compris entre 1 et 3 mm.

ii. Régulation de la croissance folliculaire

Chez les mammifères, il existe deux phases successives dans la croissance folliculaire : la folliculogénèse basale et la folliculogénèse terminale (MONNIAUX *et al.*, 2009). Les hormones impliquées dans la régulation sont différentes suivant la phase concernée.

La folliculogénèse basale est une phase dite gonadotrope indépendante. Elle concerne le développement des follicules du stade primordial au stade pré-antral ou primaire. Cette phase semble contrôlée par de nombreux facteurs de croissance d'origine ovocytaire et somatique, telle que l'activine, agissant essentiellement selon un mode paracrine de régulation (DRIANCOURT *et al.*, 1991). C'est au cours de cette phase que s'effectue l'essentiel de la croissance de l'ovocyte, à partir d'un diamètre initial de 20 à 30 μm , et que celui-ci acquiert la compétence méiotique, c'est-à-dire la capacité à reprendre la méiose (bloquée au stade diplotène) quand il est extrait de son follicule (MONNIAUX *et al.*, 2009). L'activine est formée de l'association de deux sous unités non glycolysées de l'inhibine, synthétisée par les cellules de la granulosa dont elle assure la différenciation. Elle est responsable de l'acquisition des récepteurs à FSH au niveau des cellules ovariennes (XIAO *et al.*, 1992), ce qui en fait un élément régulateur essentiel du passage des follicules du stade gonadotrope indépendant au stade gonadotrope dépendant (HANZEN *et al.*, 2000). En présence de FSH, l'activine est capable de promouvoir la synthèse d'œstradiol, l'acquisition de récepteurs à LH sur les follicules la production d'inhibine et de follistatine (HUTCHINSON *et al.*, 1987). Elle empêche également la lutéinisation précoce du follicule (FINDLAY, 1993).

Au cours de la folliculogénèse basale, la production d'AMH, faible à indétectable dans les follicules primaires, augmente dans les follicules pré-antraux pour atteindre un maximum en fin de folliculogénèse basale (VISSER et THEMME, 2005).

La folliculogénèse terminale est dite gonadotrope dépendante car elle strictement dépendante de la présence de FSH et de LH. Elle débute chez la vache lorsque les follicules ont atteint un diamètre de 3 à 4 mm. L'acquisition de cette taille correspond à diverses modifications histologiques et hormonales du follicule : il acquiert une thèque vascularisée qui permet d'avantage d'échanges avec l'environnement ovarien du follicule, sa capacité stéroïdogène augmente et se traduit par une augmentation de la synthèse d'œstradiol, la vitesse de multiplication des cellules de la granulosa s'accélère puis se réduit lorsque le follicule atteint le stade pré-ovulatoire (Hanzen *et al.*, 2000). Au cours de la folliculogénèse terminale, les cellules de granulosa perdent progressivement leur activité de prolifération et de synthèse d'AMH. Ces modifications résultent d'interactions synergiques et/ou antagonistes entre d'une part les hormones gonadotropes (LH et FSH) et d'autre part des facteurs paracrines ayant soit une action stimulatrice (IGF, œstradiol, activine, TGF β , AMH) soit une action inhibitrice (follistatine, inhibine, interleukine 6, TNF α). L'apparition de récepteurs de LH sur les cellules de granulosa est la « signature » d'une maturité complète du follicule, qui devient apte à ovuler. C'est au cours de cette phase que s'effectue la sélection du ou des follicule(s) destiné(s) à ovuler, grâce à un ensemble de mécanismes dont la finalité biologique est de réguler le nombre d'ovulations caractéristique de chaque espèce et de chaque race (MONNIAUX *et al.*, 2009).

Régulation du nombre de vagues folliculaires

La régulation du nombre de vague folliculaires par cycle est complexe. Des facteurs génétiques, nutritionnels et environnementaux propres au follicule sont impliqués.

Une double médiation des variations quantitatives et qualitatives de la progestéronémie a été mise en évidence. On a en effet observé la présence d'un plus grand nombre de follicules sur l'ovaire ipsilatéral au corps jaune (PIERSON et GINTHER, 1987), résultat éventuel de l'atrésie du follicule dominant induite localement par la progestérone capable d'y supprimer la synthèse d'œstradiol. A la différence d'un état d'imprégnation progestéronique faible (ROBERSON *et al.*, 1989; STOCK et FORTUNE, 1993; TAYLOR *et al.*, 1994), une progestéronémie élevée naturelle (RAHE *et al.*, 1980) ou induite (SAVIO *et al.*, 1993), exerce une rétroaction négative sur la libération de l'hormone LH. Il en résulte une réduction de la synthèse d'œstradiol par le follicule dominant et par conséquent son atrésie.

Ainsi, au cours du cycle, si la progestérone diminue alors que le follicule dominant de la deuxième vague de croissance folliculaire est en phase de croissance, ce dernier va ovuler et le cycle ne comportera que deux vagues. Si au contraire, la progestérone se maintient à un niveau élevé après que le follicule dominant de la deuxième vague ait atteint sa taille de croissance maximale, ce follicule va régresser et une troisième vague de croissance folliculaire débute (TAYLOR et RAJAMAHENDRAN, 1991).

Régulation du recrutement folliculaire

Le recrutement de plusieurs follicules est principalement induit par la FSH. Chaque vague de croissance folliculaire est précédée, 2 à 4 jours plus tôt d'une augmentation de FSH (ADAMS *et al.*, 1992; SUNDERLAND *et al.*, 1994). La première augmentation de la FSH apparaît le jour de l'ovulation. Ces pics de FSH sont également observés chez les génisses pré-pubères (ADAMS *et al.*, 1994). Le jour de l'ovulation, la concentration importante d'inhibine contenue dans le liquide folliculaire retarde l'apparition de la première vague de croissance folliculaire et du premier follicule dominant (TURZILLO et FORTUNE, 1990).

L'hormone anti-müllérienne joue un rôle important dans le recrutement folliculaire. Sa concentration augmente dans les follicules pré-antraux pour atteindre un maximum en fin de folliculogénèse basale. L'une des actions principales de l'AMH lors de sa fixation sur ses récepteurs au niveau de l'ovaire est l'inhibition du recrutement des follicules primaires. Cette inhibition se fait probablement par effet paracrine de l'AMH produite par les follicules antraux et pré antraux sur les follicules primordiaux. Sans AMH, le recrutement des follicules primordiaux est plus important et on observe un arrêt plus précoce des cycles et de la folliculogénèse (TSEPELIDIS *et al.*, 2007).

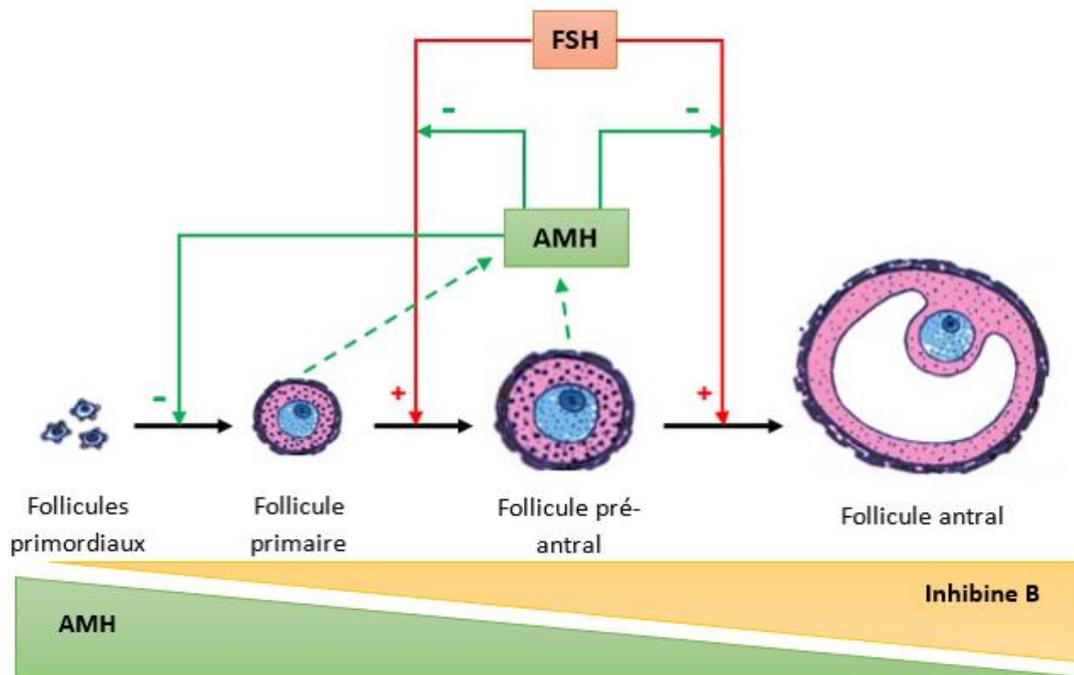


Figure 5 : Schéma représentant le rôle de l'AMH, de la FSH et de l'inhibine sur la maturation folliculaire chez la vache (inspiré de DURLINGER et al., 2002)

Rôles des facteurs de croissance

L'hormone de croissance, GH, et ses analogues, sont bien connus en élevage bovin, ils permettent d'améliorer la croissance folliculaire et la synthèse d'œstradiol (DE LA SOTA *et al.*, 1993). L'action de la GH s'exerce au niveau de l'ovaire, elle active la sécrétion d'IGF 1 (*Insulin Growth Factor type 1*) par les follicules, se traduisant par une augmentation globale du taux d'ovulation (HANZEN *et al.*, 2000). En effet, dans les protocoles de super-ovulation, une administration d'un analogue de l'hormone de croissance amplifie le nombre d'embryons collectés. L'hormone de croissance stimule également le développement du corps jaune lorsqu'elle est administrée dans les 9 premiers jours du cycle. Elle peut retarder sa régression si elle est administrée plus tard au cours du cycle (LUCY *et al.*, 1994).

De nombreux facteurs de survie, de prolifération et de différenciation folliculaires ont été identifiés au niveau ovarien. Leurs interactions sont complexes et leurs rôles variés. Ils peuvent en effet agir sur les cellules responsables de leur synthèse (autocrinie), ou sur d'autres cellules du follicule par la voie locale (paracrinie) ou sanguine (endocrinie). Par ailleurs, ils peuvent également agir par des mécanismes additionnels tels, la juxtacrinie (activation de récepteurs sur la cellule adjacente via des facteurs de croissance attachés à la membrane cellulaire) et l'intracrinie (stimulation de la cellule où le facteur de croissance est produit sans production préalable de ce facteur de croissance) (HANZEN *et al.*, 2000). On parle de système de facteurs de croissance car leurs interactions sont étroites. Le tableau suivant résume les différentes actions de ces systèmes.

Tableau I : Actions paracrines exercées par les facteurs de croissance sur les cellules de la granulosa in vitro (source : MONNIAUX et MONGET, 1997)

	Facteurs de stimulation	Facteur d'inhibition
Survie	IGF EGF TGF α FGF Activine Interleukine 1	IGFBP Follistatine TGF β Interleukine 6 TNF α Interféron γ
Prolifération	IGF EGF TGF α et TGF β FGF Activine Interleukine 1 TNF α	IGFBP Follistatine TGF β Interleukine 6 Interféron γ
Différenciation	IGF TGF β Activine	IGFBP Follistatine Inhibine EGF TGF α et TGF β FGF Interleukine 6 TNF α

IGF : Insulin Growth Factor
 IGFBP : Insulin Growth Factor Binding Protein
 EGF : Epidermal Growth Factor
 TGF : Transforming Growth Factor
 FGF : Fibroblast Growth Factor
 TNF : Tumor Necrosis Factor

Contrôle hormonal de la phase de sélection

La phase de sélection est caractérisée par une diminution de la concentration en FSH et d'une augmentation progressive de la synthèse d'œstradiol du fait de l'augmentation des pulses de LH. L'augmentation de l'œstradiol, et plus précisément du rapport entre œstradiol et androgènes constitue une caractéristique de la dominance fonctionnelle du follicule en croissance (SUNDERLAND *et al.*, 1994). Dans le liquide folliculaire la concentration en inhibine augmente. La rétroaction de l'inhibine et de l'œstradiol entraîne une réduction de la synthèse de FSH. Ainsi, après 2-3 jours de recrutement, avec les concentrations grandissantes en œstradiol et inhibine, la concentration en FSH atteint un seuil inférieur à celle induisant un recrutement (ADAMS *et al.*, 1992b). Le recrutement s'arrête et l'excédent de follicule s'atrophie.

L'inhibine est une glycoprotéine appartenant à la famille des TGF β . Comportant deux sous-unités. Elle est essentiellement synthétisée par les cellules de la granulosa (FINDLAY *et al.*, 1991). L'activine, la FSH, la LH à faibles doses, l'IGF-1 et le TGF β stimulent la production d'inhibine. A l'inverse, l'EGF, le TGF α , la follistatine, l'interféron gamma et la LH à fortes doses exercent un effet inhibiteur en présence de FSH (FINDLAY, 1993).

Notion de dominance folliculaire

La nature exacte et précise du facteur qui détermine le caractère dominant d'un follicule est encore inconnue. Récemment, il a été observé que la sélection du follicule dominant apparaît 36 à 48 heures après le début du recrutement (BAO *et al.*, 1997a). Elle est temporellement liée à l'expression par le follicule de l'ARN messager lié aux récepteurs à l'hormone LH (BAO *et al.*, 1997a, 1997b). Le premier follicule qui acquiert des récepteurs à l'hormone LH devient le follicule dominant car ses cellules granuleuses sont capables de répondre aux hormones LH et FSH (BAO et GARVERICK, 1998).

L'implication de l'inhibine dans l'expression de la dominance physiologique d'un follicule est très fortement envisagée. En effet, la concentration de l'inhibine est plus élevée dans les follicules dominants que dans les autres follicules (PADMANABHAN *et al.*, 1984). Le traitement de vaches à différents stades du cycle au moyen de liquide folliculaire renfermant de l'inhibine retarde voire supprime le développement folliculaire (KASTELIC *et al.*, 1990; TURZILLO et FORTUNE, 1990) et retarde l'apparition de l'œstrus (FORTUNE, 1993). L'inhibine semble limiter la conversion d'androgènes en œstrogènes en agissant sur l'aromatase responsable de cette transformation (WOODRUFF *et al.*, 1990). L'augmentation de l'inhibine inhibe de manière endocrine la sécrétion de FSH et par conséquent la croissance d'autres follicules. La croissance du follicule dominant en l'absence de FSH est rendue possible grâce à l'intervention de l'IGF-1 synthétisé en grande concentration par le follicule dominant. L'IGF-1 amplifie l'effet de la FSH (ECHTERNKAMP *et al.*, 1990). L'IGF-1 stimule l'aromatase des androgènes en œstrogènes (ADASHI *et al.*, 1985). L'œstradiol ainsi produit stimule en retour la production d'IGF-1. Ce double rétrocontrôle explique l'augmentation rapide de l'œstradiol dans le follicule dominant. A l'inverse, les follicules dominés ne disposant pas de ce mécanisme compensatoire sont voués à l'atrésie (FINDLAY, 1993).

Contrôle hormonal de la phase de dominance

La phase finale de la période de dominance voire la phase finale de la maturation folliculaire préalable à l'ovulation se traduit notamment par une augmentation très nette des œstrogènes. Cette synthèse suppose la coopération des cellules de la thèque et de la granuleuse et l'intervention des hormones gonadotropes LH et FSH, la LH induisant la formation d'androgènes par la thèque interne et la FSH assurant l'aromatase de ceux-ci en œstrogènes par la granuleuse (RICHARDS *et al.*, 1987).

Chez la vache, ce processus présente la particularité de pouvoir être observé à des moments différents du cycle c'est-à-dire en présence ou en l'absence d'une imprégnation progestéronique. Dans le premier cas, la synthèse d'androgènes et leur aromatisation en œstrogènes ne se prolonge pas au-delà du 8^{ème} voire du 10^{ème} jour du cycle en ce qui concerne le follicule dominant de la première vague (BADINGA *et al.*, 1992; SUNDERLAND *et al.*, 1994). Cet effet limité dans le temps est imputable à l'augmentation de la progestérone dont on sait l'effet inhibiteur qu'elle exerce sur l'activité de l'aromatase (FORTUNE et VINCENT, 1983). La fin de la phase de dominance du follicule est précédée de la perte par ce follicule de sa capacité à supprimer l'effet FSH, à produire des œstrogènes et par la perte de ses récepteurs à

LH et FSH (ADAMS *et al.*, 1992b). Cette période coïncide avec l'émergence d'une nouvelle vague de croissance folliculaire à nouveau précédée par une augmentation transitoire de la FSH.

A l'inverse, la lutéolyse induit une augmentation drastique de la synthèse d'androgènes et de leur aromatisation en œstradiol dans le follicule dominant (FORTUNE *et al.*, 1988). Cette augmentation résulte d'une sensibilité accrue de la thèque à l'action de l'hormone LH dont par ailleurs la concentration basale et la pulsativité coïncident avec la diminution de la progestérone (RAHE *ET AL.*, 1980; WALTERS et SCHALLENBERGER, 1984). Ce changement de la concentration de l'hormone LH en présence de concentrations basales en FSH sont essentielles pour le devenir ovulatoire du follicule dominant. Il apparaît donc que c'est la réduction de la pulsativité de l'hormone LH qui serait responsable de l'atrésie des follicules dominants des première et surtout deuxième vague de croissance folliculaire (LUCY *et al.*, 1992).

iii. Régulation hormonale du cycle ovarien

Le cycle œstral est mis en place à la puberté, entre 6 et 18 mois chez les bovins. La vache est une espèce poly-oestrienne permanente, chez laquelle la durée moyenne d'un cycle est de 21 jours.

Le contrôle de l'activité endocrine de l'ovaire est basé sur un ensemble de rétrocontrôles entre l'ovaire et le système hypothalamo-hypophysaire qui fait intervenir diverses hormones. Le système hypothalamo-hypophysaire permet une intégration des informations de différents facteurs endogènes (signaux hormonaux et nutritionnels) et exogènes (photopériode, température, stress...).

L'hypophyse et plus précisément l'adénohypophyse sécrète les gonadotropines, LH et FSH. La sécrétion de ces hormones est sous le contrôle de la GnRH, une neurohormone sécrétée directement dans les capillaires sanguins de la tige pituitaire. La GnRH synthétisée par les neurones de l'hypothalamus stimule la synthèse et la sécrétion de FSH et LH en se fixant sur les récepteurs situés à la surface des cellules gonadotropes. La LH permet la lutéinisation des cellules du follicule et stimule le follicule à produire les androgènes. La FSH stimule l'aromatisation des androgènes en œstrogènes et stimule la croissance folliculaire. Son action s'exerce plus sur les follicules antraux que sur les follicules pré-antraux présents au sein de la même cohorte de recrutement (RICHARDS *et al.*, 1987).

Les stéroïdes, en particulier l'œstradiol 17 β d'origine ovarienne, inhibent la sécrétion pulsatile de la GnRH par un rétrocontrôle négatif. Cependant en fin de croissance folliculaire et au-delà d'une concentration seuil, l'œstradiol exerce une action positive sur le système hypothalamo-hypophysaire. En effet, la concentration en œstradiol 17 β augmente fortement à l'approche de l'ovulation (il passe de 5 pg/mL à 14 pg/mL) (Dobson and Dean, 1974), ainsi, le rétrocontrôle négatif est levé ce qui provoque à la fois une augmentation des pulses de la GnRH et une augmentation importante de la sensibilité hypophysaire. L'association de ces effets conduit à une décharge massive de LH qui déclenche l'ovulation des follicules pré-ovulatoires présents sur l'ovaire.

Les autres œstrogènes sécrétés au cours du cycle chez la vache sont l'œstradiol 17 α et l'œstrone (Dobson and Dean, 1974). L'œstrone présente des variations cycliques de faible amplitude au cours du cycle avec une concentration moyenne de 4 pg/mL. La concentration en œstradiol 17 α ne présente pas de variation significative au cours du cycle.

Après l'ovulation, un corps jaune se forme, croît et secrète la progestérone qui exerce une rétroaction négative sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, ce qui empêche la libération des gonadotropines hypophysaires. En fin de phase lutéale et en absence d'embryon dans l'utérus, les prostaglandines secrétées induisent la lutéolyse. La régression du corps jaune lève l'action inhibitrice de la progestérone sur l'axe hypothalamo-hypophysaire et un nouveau cycle commence.

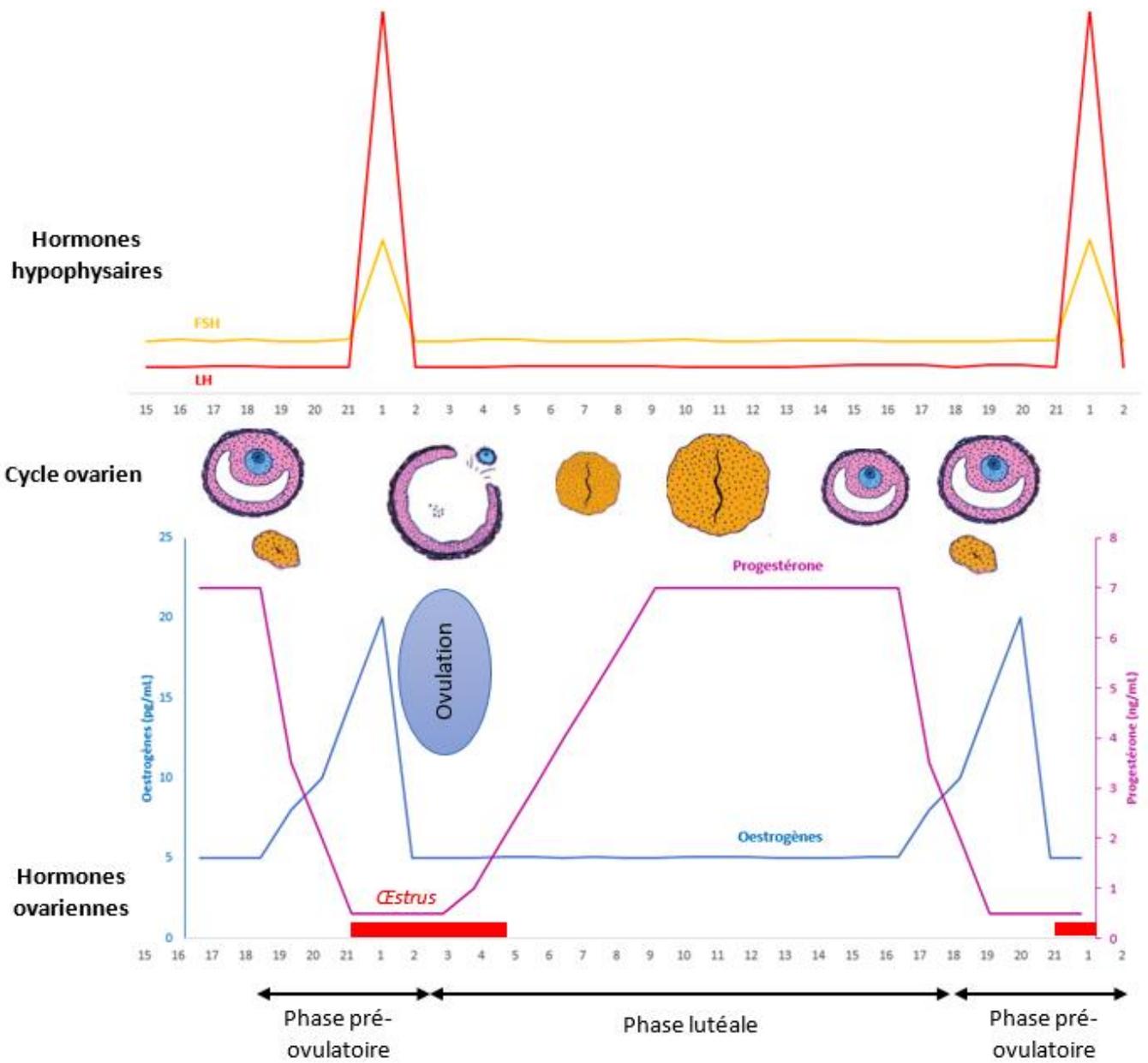


Figure 6 : Profil hormonal au cours du cycle sexuel de la vache

II. L'hormone anti-müllérienne, hormone indicatrice de la réserve ovarienne

L'hormone anti-müllérienne ou AMH, est connue depuis longtemps pour son action inhibitrice sur les canaux de Müller chez les fœtus mâles, découverte par Alfred Jost en 1947. Depuis, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence d'autres rôles de cette hormone laissant envisager une utilisation possible de cette dernière dans la gestion des troupeaux de vaches laitières et allaitantes.

Au cours des 10 dernières années, l'hormone anti-müllérienne a été étudiée dans le cadre des techniques de reproduction assistées chez la femme. En effet, il est reconnu que la concentration en AMH est un très bon indicateur du vieillissement ovarien chez la femme. Des études ont également prouvé que ce résultat est transposable chez l'espèce bovine. Un lien a également été établi entre la concentration en AMH et la réponse aux traitements de super-ovulation dans le cadre des transferts d'embryons chez la femme et la vache. Ce lien est une découverte intéressante à approfondir en élevage bovin.

De nos jours, les éleveurs s'intéressent de plus en plus aux différents marqueurs pouvant déterminer le potentiel reproducteur de leurs animaux. Au vu des études déjà réalisées, l'AMH semble être une piste intéressante à approfondir dans cet objectif.

a. Description

L'hormone anti-müllérienne est une glycoprotéine dimérique, dont le poids moléculaire est de 145 000 Da. Le gène codant pour l'hormone anti-müllérienne est localisé à l'extrémité du bras court du chromosome 19 (COHEN-HAGUENAUER *et al.*, 1987). La séquence du gène bovin et du gène humain sont homologues à 78% (CATE *et al.*, 1986).

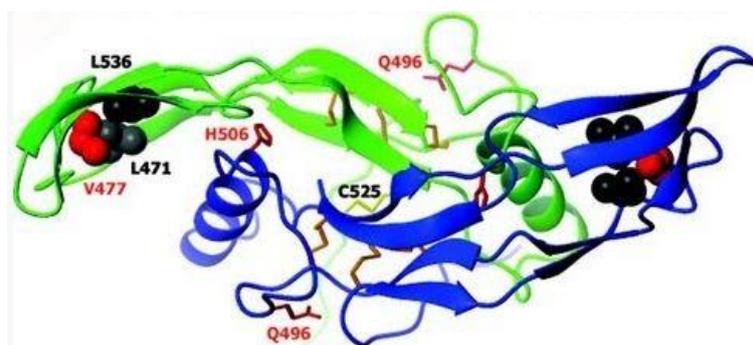


Figure 7 : Modélisation moléculaire de l'hormone anti-müllérienne humaine (source : "Austin IVF Cycles" 2014)

Ses deux sous unités sont reliées par des ponts disulfure ce qui l'apparente à la famille des *transforming growth factors* β (TGF β) avec lesquels elle partage une homologie d'environ 20% (CATE *et al.*, 1986, ROBERTS *et al.*, 1985). Les TGF β potentialisent la sécrétion d'œstrogènes par l'ovaire (YING *et al.*, 1986). Ils exercent également des actions complexes sur la croissance cellulaire des cellules épithéliales et mésenchymateuses.

Elle est également génétiquement proche de la famille des inhibines/activines. L'inhibine B est sécrétée par les cellules de la granulosa chez la femelle et par les cellules de Sertoli chez le mâle et joue le rôle d'agent de rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Ces similitudes génétiques permettent d'avoir des pistes quant à l'action possible de l'hormone anti-müllérienne sur l'ovaire et sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Des nombreuses études ont été réalisées dans le but de décrire précisément ces effets.

b. Sécrétion de l'hormone anti-müllérienne

i. Généralités

L'hormone anti-müllérienne est principalement sécrétée par les cellules de Sertoli chez le mâle. Mais, elle est également produite au niveau des cellules de la granulosa (cellules ovariennes homologues des cellules de Sertoli) qui entourent l'ovocyte au niveau du follicule chez la femelle (VIGIER *et al.*, 1984a). La quantité produite par les cellules de la granulosa est environ mille fois plus faible que celle synthétisée par les cellules de Sertoli, mais, à dose égale, l'activité de l'AMH testiculaire ou ovarienne est identique. Elle est absente de l'ovaire du fœtus femelle mais on la retrouve au moment de la naissance et chez l'animal prépubère (TAKAHASHI *et al.*, 1986a).

La concentration en hormone anti-müllérienne dépend de la taille du follicule. Elle est maximale dans la granulosa externe des follicules de 1,5 à 3,5 mm de diamètre, correspondant aux follicules antraux. Dans les follicules de 1,5 à 3,5 mm on observe un gradient de concentration en AMH : la concentration en AMH est la plus élevée au niveau des cellules de la granulosa externe. De plus, la concentration en AMH diminue drastiquement lors de l'atrésie folliculaire (RICO *et al.*, 2011). En revanche, on ne retrouve jamais d'AMH dans les follicules primordiaux, ni dans les cellules de la thèque, ni dans le stroma ovarien, ni dans le corps jaune.

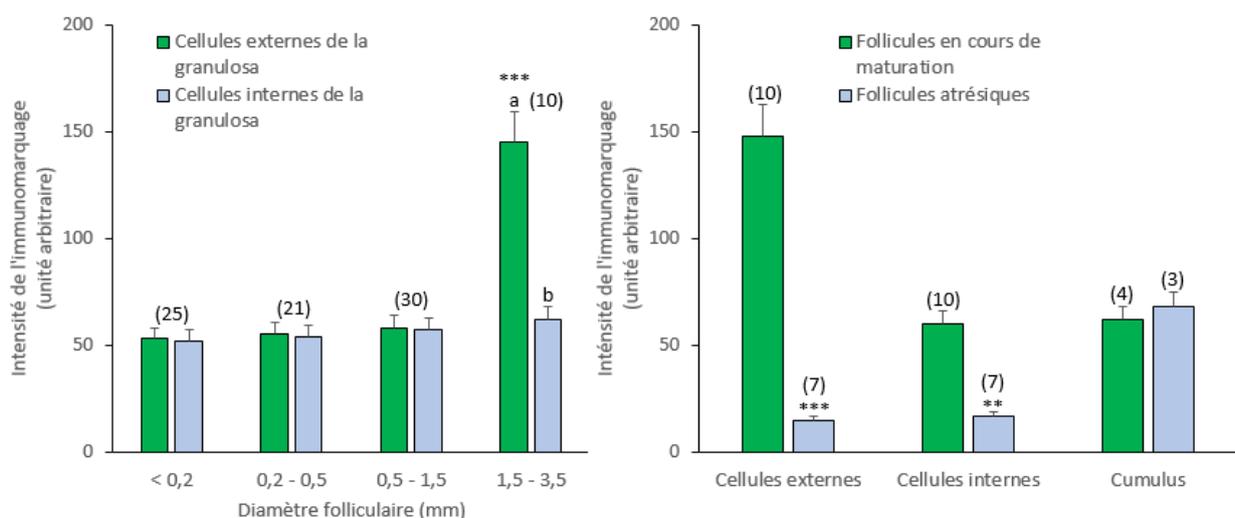


Figure 8 : Variation de la quantité en AMH dans les cellules de la granulosa pendant la maturation folliculaire et l'atrésie

Les astérisques indiquent une différence significative.
(source : RICO *et al.*, 2011)

Ainsi, les follicules majoritairement responsables de la concentration en AMH sont les follicules antraux mesurant entre 1 et 5 mm de diamètre (RICO *et al.*, 2011, 2009). Cependant, mais on ne peut pas exclure l'implication des follicules pré-antraux de taille équivalente.

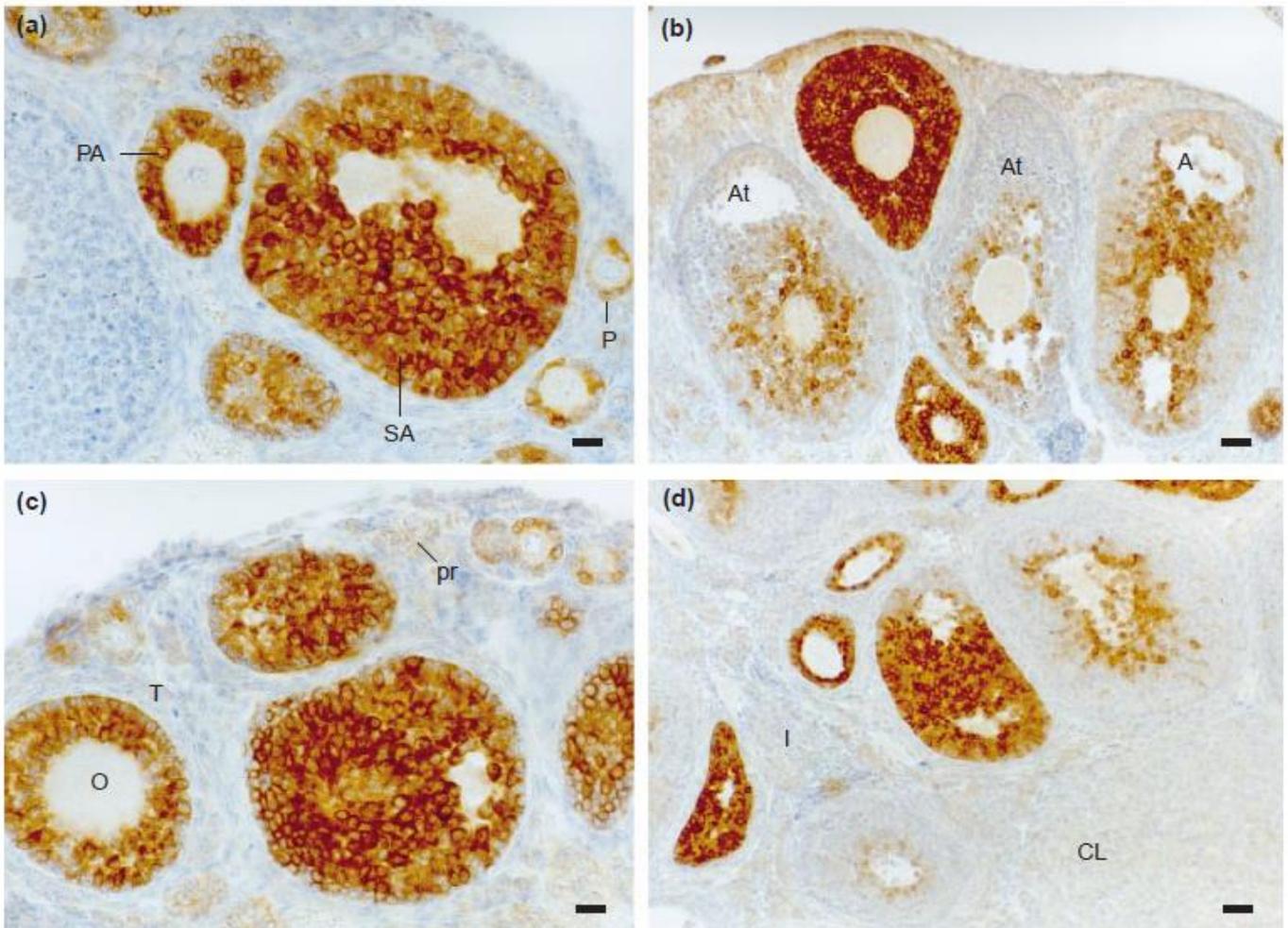


Figure 9 : Immunomarcage montrant la localisation de l'expression de l'hormone anti-müllérienne au sein d'un ovaire de souris

P = follicule primaire, PA = follicule pré-antral, SA = follicule antral, At = follicules atrésiques, A = follicule antral, pr = follicule primordial, O = ovocyte, T = cellules de la thèque, CL = corps jaune, I = cellules interstitielles (source : DURLINGER et al., 2002)

Le fait qu'elle soit uniquement sécrétée par les cellules de la granulosa des follicules en maturation en fait donc un marqueur de choix pour évaluer le nombre de follicules engagés dans les vagues de croissance folliculaire successives. En effet, sa concentration sera proportionnelle au nombre de follicules en cours de maturation présents.

Malgré cette expression très ciblée dans l'ovaire, on retrouve également l'hormone anti-müllérienne dans le plasma sanguin, ce qui permet de doser la concentration circulante d'AMH par simple prise de sang. On peut ainsi, en théorie, évaluer la quantité de follicules antraux et pré-antraux présents chez la vache par un simple prélèvement sanguin.

ii. Particularités chez le mâle

La sécrétion de l'AMH testiculaire est maximale au moment de la régression des canaux de Müller lors du développement embryonnaire puis elle diminue progressivement jusqu'à atteindre un palier avant la puberté. La maturation pubertaire des cellules de Sertoli entraîne une baisse importante de la production d'AMH par ces dernières (VIGIER *et al.*, 1983).

c. Rôles de l'hormone anti-müllérienne

i. Au cours de l'embryogénèse

Le rôle de l'hormone anti-müllérienne au cours de l'embryogénèse est connue depuis 1947. Chez l'embryon femelle, les canaux de Müller persistent et se différencient en trompes de Fallope, utérus et partie supérieure du vagin. Chez l'embryon mâle, la régression des canaux de Müller est observée très précocement, dès l'âge de huit semaines, et constitue le premier signe de différenciation sexuelle de l'appareil génital. L'hormone anti-müllérienne, sécrétée par les cellules de Sertoli du testicule fœtal est responsable de la régression des canaux de Müller chez les fœtus mâles. Elle joue donc un rôle majeur dans la différenciation sexuelle de l'appareil génital.

De plus, lorsqu'un fœtus femelle se trouve trop précocement en contact avec l'hormone anti-müllérienne (lors de gestation gémellaire hétérosexuelle par exemple), une régression des canaux de Müller chez le fœtus femelle est observée (VIGIER *et al.*, 1984b). Dans le cas du freemartinisme, l'AMH ne se contente pas de faire disparaître l'utérus et les trompes de la femelle freemartin, elle s'attaque également à l'ovaire lui-même, dont elle décime la population germinale et dont elle masculinise l'architecture, y faisant apparaître des structures ressemblant à des tubes séminifères capables de produire de l'AMH à leur tour. Néanmoins, la sensibilité de l'ovaire fœtal est limitée dans le temps, ce qui explique pourquoi l'apparition tardive d'une production d'AMH par les cellules de la granulosa ne perturbe pas l'organogénèse de l'ovaire normal.

ii. Au cours de la folliculogénèse

La mise en évidence de récepteurs de type II à l'AMH au niveau de l'ovaire adulte (BAARENDS *et al.*, 1994) a permis d'identifier d'autres rôles de l'AMH, notamment au niveau de la folliculogénèse. Ces récepteurs sont présents dans les cellules de la granulosa mais également dans les cellules de la thèque des follicules pré-antraux et antraux.

Le premier rôle de l'AMH au sein de l'ovaire, mis en évidence, est l'inhibition de la méiose des ovocytes matures *in vitro* chez la souris (TAKAHASHI *et al.*, 1986b). Cependant, cet effet n'a pas pu être reproduit *in vivo*. Il semble donc que l'AMH agisse sur le follicule par le biais des cellules de la granulosa et de la thèque et non pas via l'ovocyte.

L'une des actions principales de l'hormone anti-müllérienne lors de sa fixation sur ses récepteurs au niveau de l'ovaire est l'inhibition du recrutement des follicules primaires. En effet, chez des souris AMH-*Knock Out* (souris femelles déficientes pour le gène codant pour l'AMH), le nombre de follicules primordiaux décroît rapidement. Ainsi, l'AMH limite le recrutement folliculaire ce qui permet de conserver un pool de follicules primaires important. Cette inhibition se fait probablement par effet paracrine de l'AMH produite par les follicules antraux et pré antraux sur les follicules primordiaux. Sans AMH, le recrutement des follicules primordiaux est plus important et on observe un arrêt plus précoce des cycles et de la folliculogénèse (TSEPELIDIS *et al.*, 2007).

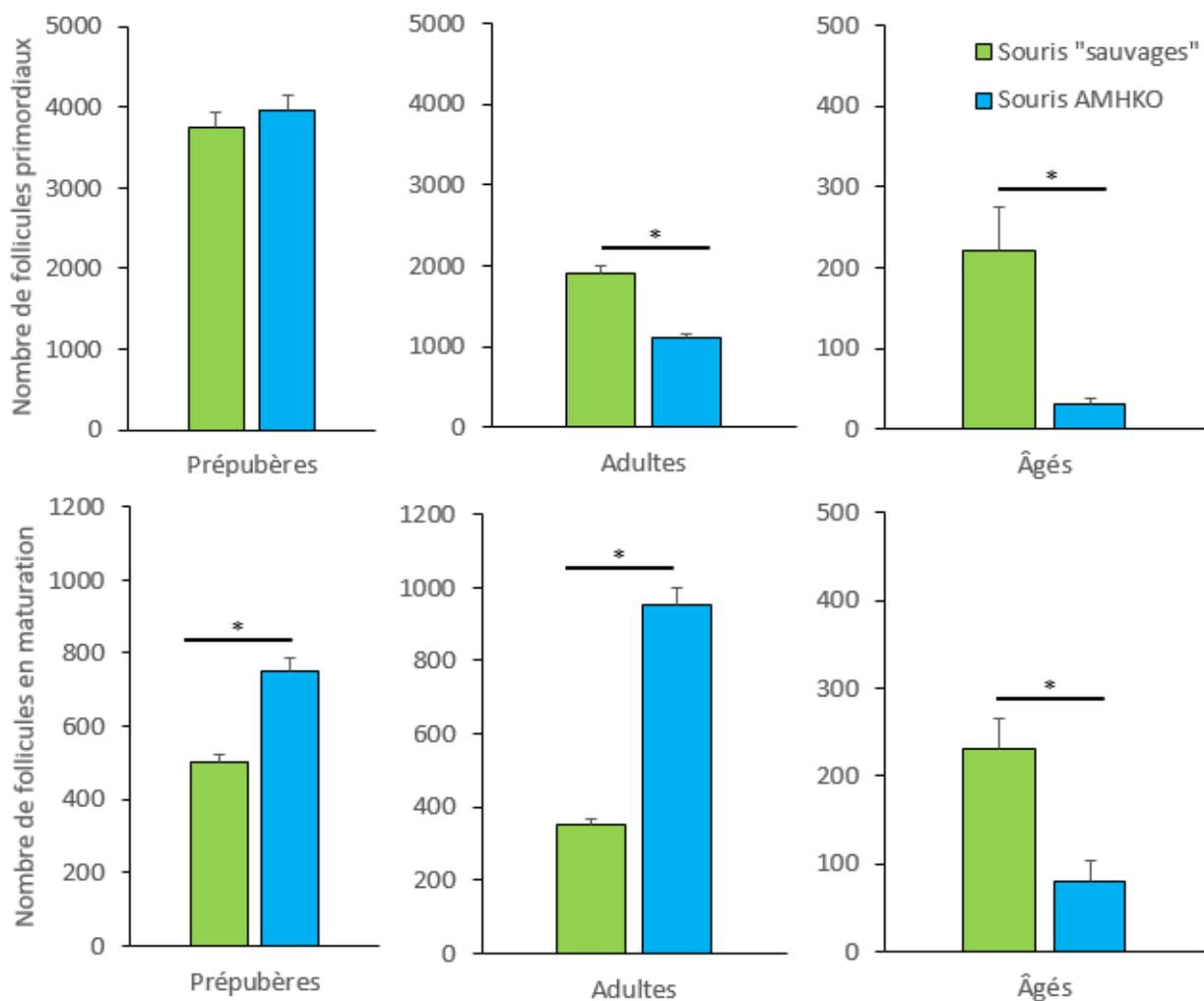


Figure 10 : Nombre de follicules primordiaux et antraux chez des souris de génotype « sauvage » et des souris AMHKO (anti-müllérien hormone knockout) suivant l'âge des individus

Les astérisques représentent les différences significatives ($P \leq 0.05$)
(source : DURLINGER *et al.*, 2002)

Aucun phénomène de rétro contrôle de cette activité n'a été mis en évidence pour l'instant, ainsi, l'action de l'AMH dépend entièrement de la quantité intrinsèque de récepteurs et d'hormones produits.

Une concentration basse d'AMH est donc responsable d'un vieillissement ovarien plus rapide. La concentration en AMH est ainsi un très bon indicateur de l'appauvrissement folliculaire et par conséquent du pool folliculaire ovarien restant (Durlinger et al., 2002).

L'AMH joue également un rôle dans la sensibilité à la FSH des follicules recrutés. Elle inhibe la croissance folliculaire en limitant l'effet de la FSH sur les follicules en croissance basale et terminale. Ainsi, elle fait partie des facteurs déterminants le seuil de FSH nécessaire pour qu'un follicule donné entre dans la phase de maturation. Seuls les follicules exprimant un faible niveau d'AMH sont recrutés : une faible concentration en AMH correspondant à une sensibilité accrue à la FSH (DURLINGER *et al.*, 2002).

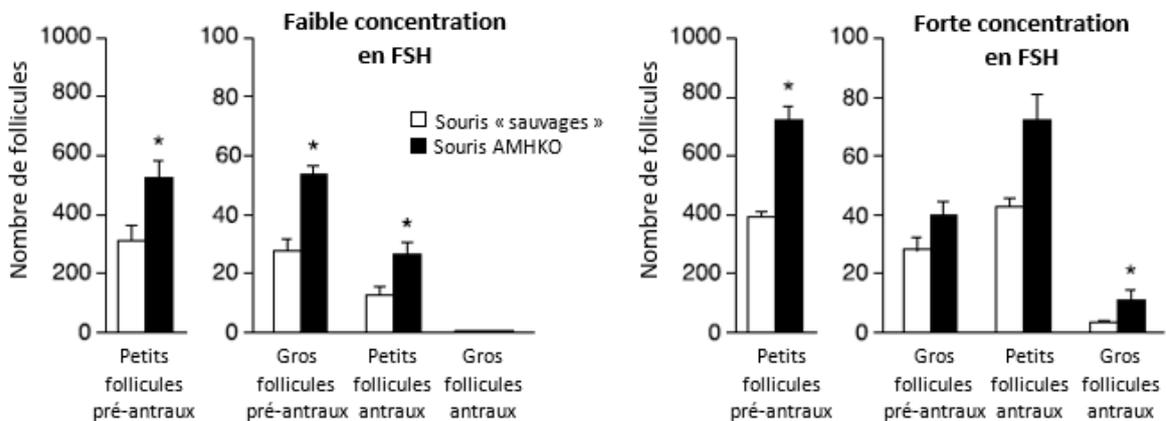


Figure 11 : Variation du nombre de follicules au sein des ovaires en fonction de la concentration en FSH

Les astérisques représentent les différences significatives ($P \leq 0.05$)
(source : DURLINGER *et al.*, 2002)

De plus, il semble probable que l'AMH soit impliquée dans le développement des follicules primordiaux. On a longtemps pensé que seule la FSH était responsable du développement de ces derniers mais des études récentes ont montré qu'en absence de FSH, le nombre de follicules primordiaux était maintenu constant grâce à la présence d'AMH (DURLINGER *et al.*, 2001).

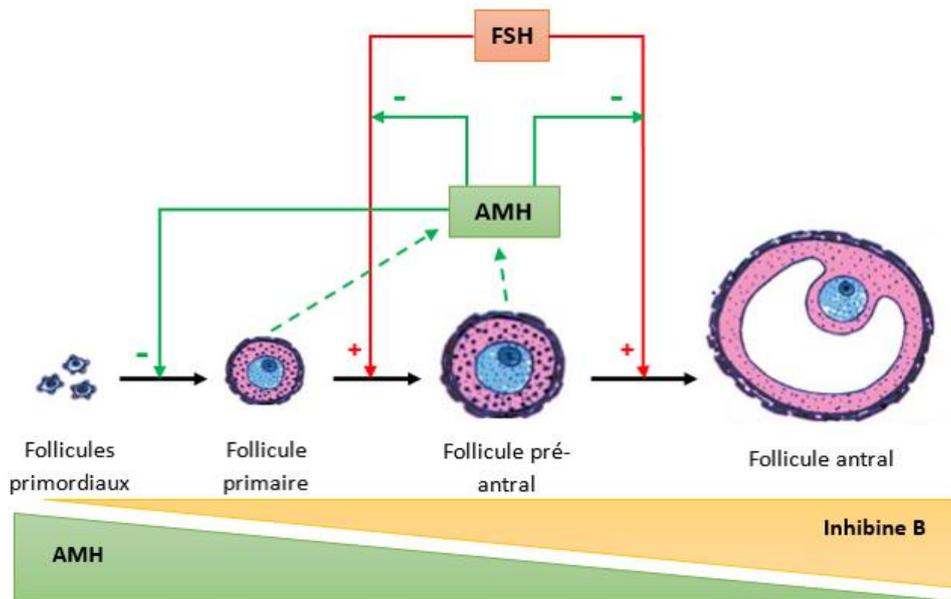


Figure 12 : Schéma représentant le rôle de l'AMH, de la FSH et de l'inhibine sur la maturation folliculaire (inspiré de DURLINGER et al., 2002)

L'hormone anti-müllérienne est donc une hormone qui garantit la réserve ovarienne tout au long de la vie de la femelle en favorisant le développement des follicules primordiaux et en limitant le recrutement folliculaire.

iii. Au cours de la stéroïdogénèse ovarienne

L'hormone anti-müllérienne inhibe l'activité aromatasase des cellules de la granulosa et réduit donc la production de prostaglandines E2.

iv. Chez le mâle

L'hormone anti-müllérienne est la première protéine identifiée produite par les cellules de Sertoli. Elle n'est synthétisée que lorsque la différenciation testiculaire s'est déjà manifestée par la formation de tubes séminifères, c'est-à-dire à environ huit semaines chez le fœtus humain (JOSSO *et al.*, 1993b). La production d'AMH se poursuit pendant toute la vie fœtale et décroît ensuite jusqu'à la puberté où sa production est inhibée par la sécrétion de testostérone.

On peut donc se poser la question suivante : l'AMH joue-t-elle un rôle physiologique dans le testicule, à un moment quelconque du développement puisqu'elle continue à être produite par la cellule de Sertoli immature bien après la régression complète des canaux de Müller ? La présence du récepteur de l'AMH dans les cellules de Sertoli jusqu'à la puberté est un indice de plus en faveur d'un rôle paracrine ou autocrine de l'AMH. Ce récepteur est présent dans les cellules de Sertoli immatures et le long des canaux de Müller. L'AMH semble jouer un rôle indirect dans la différenciation testiculaire en s'opposant à la production d'œstrogènes du fait de son activité anti-aromatase (JOSSO *et al.*, 1993a). Après la naissance, elle pourrait favoriser la prolifération des gonocytes primordiaux (ZHOU *et al.*, 1993) et jouer un rôle inhibiteur de la stéroïdogénèse.

En clinique humaine, le dosage sérique de l'AMH est un excellent marqueur de la présence et de la valeur fonctionnelle du testicule pré-pubertaire, d'autant plus que la production d'AMH par les cellules de Sertoli n'exige pas une stimulation préalable par l'hCG (human Chorionic Gonadotropin). Comme, avant la puberté, le testicule est le seul organe à produire de l'AMH en quantité dosable dans le sérum, le fait de détecter de l'AMH circulante, même à faible concentration, suffit à prouver l'existence de cellules de Sertoli fonctionnelles.

En pratique vétérinaire, l'hormone anti-müllérienne est principalement étudiée car elle donne une idée précise du pool folliculaire restant chez les bovins. L'étude de Walsh *et al.* en 2014 a mis en évidence que le nombre de follicules antraux présente une héritabilité de $0,31 \pm 0,14$ chez les adultes, $0,25 \pm 0,13$ chez les génisses, ce qui fait de lui un facteur génétique d'héritabilité moyenne. Une mesure de la concentration en AMH peut donc permettre d'identifier à la fois les animaux les plus fertiles mais également les animaux dont les descendants seront eux-mêmes plus fertiles. À notre époque où la recherche de performance, notamment génétique est au centre des discussions, la recherche de marqueurs génétiques associés à l'AMH permettrait de sélectionner les taureaux capables de donner les génisses les plus fertiles.

d. Modulation et régulation de l'hormone anti-müllérienne chez la femelle

On observe une forte modulation de la production d'hormone anti-müllérienne en fonction de l'âge et du sexe, ce qui laisse penser que la régulation de la sécrétion d'AMH pendant la vie embryonnaire et la vie d'adulte est très contrôlée. Cependant très peu d'études sont parvenues à des conclusions satisfaisantes quant à cette régulation.

Une étude portant sur des rates prépubères, a permis de mettre en évidence l'existence d'une régulation négative de l'œstradiol sur l'expression des récepteurs de type II à AMH au niveau de l'ovaire (BAARENDS *et al.*, 1995).

Chez des vaches, Rico *et al.* en 2011 ont montré que l'administration de FSH diminue l'expression de l'AMH. Cette hypothèse avait déjà été évoquée par les travaux de Baarends *et al.* en 1995 et de Thomas *et al.* en 2007.

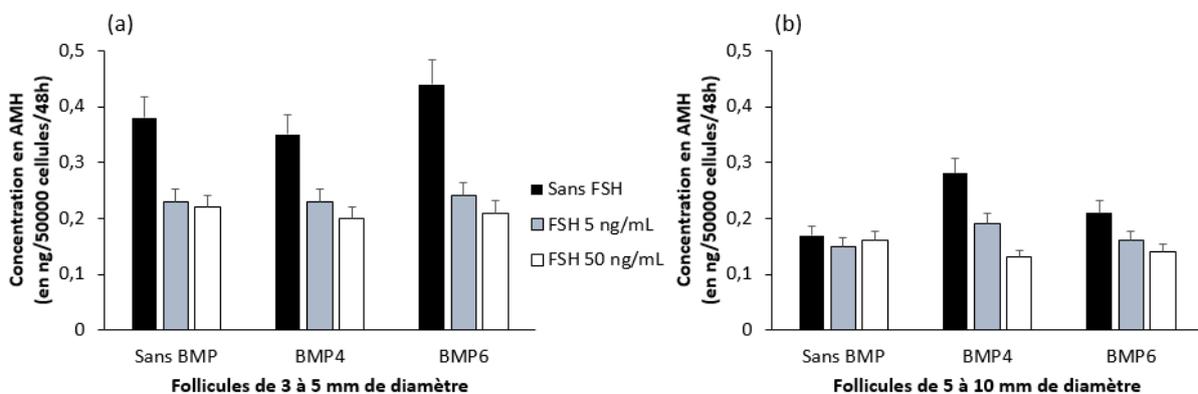


Figure 13 : Effet in vitro de la FSH, du BMP4 et du BMP6 sur la sécrétion d'AMH par les cellules de la granulosa de follicules de 3 à 5 mm (a) et de 5 à 10 mm (b) de diamètre

(source : RICO *et al.*, 2011)

Un facteur d'origine ovocytaire, de la famille des *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) produit par les cellules de la granulosa stimule également la production d'AMH (ELVIN *et al.*, 2000; RICO *et al.*, 2011). Ce facteur intervient également dans le nombre d'ovulation naturelles par cycle.

Des facteurs intra-folliculaires tels que les BMP (issus des cellules de la thèque et de l'ovocyte) stimulent donc la production d'AMH alors que la FSH inhibe son expression. Ceci expliquerait la légère diminution de la quantité d'AMH en post œstrus du fait des pics de FSH pré et péri ovulatoires.

Cependant, d'autres facteurs de régulation, notamment un facteur d'origine thécal, existent probablement, des études supplémentaires sont nécessaires pour préciser ces interactions.

e. Cinétique de l'hormone anti-müllérienne plasmatique au cours de la vie chez les bovins

i. *Avant la maturité sexuelle*

D'ordre général, la concentration plasmatique en hormone anti-müllérinne est beaucoup plus élevée chez les bovins que chez les autres espèces (notamment la femme). À la naissance, la concentration en AMH des jeunes bovins mâles est très largement supérieure à celle des jeunes bovins femelles. En effet, elle est supérieure à 700 ng/mL chez les mâles et inférieure à 120 ng/mL chez les femelles (ROTA *et al.*, 2002).

L'évolution de la concentration en AMH chez les femelles prépubères n'a pas encore été étudiée en détail. Mais dans l'étude de Rico *et al.* en 2012, le taux d'AMH reste stable durant la première année de vie des génisses.

Chez les bovins mâles, le taux d'AMH augmente durant les 5 premiers mois de vie puis décroît rapidement lorsque la testostérone passe la valeur seuil de 1,5 ng/mL (ROTA *et al.*, 2002). Ainsi, comme décrit chez l'homme (REY *et al.*, 1993), la maturation des cellules de Sertoli sous l'influence de la testostérone diminue leur sécrétion d'AMH.

Dans leur étude de 2002, Rota *et al.* s'intéressent également au cas particulier du freemartinisme (dans le cadre d'une gestation gémellaire hétérosexuelle). Les femelles freemartines présentent un taux d'AMH semblable à celui d'un veau mâle. Cependant, la concentration en AMH diminue rapidement pour se retrouver dans les valeurs usuelles des jeunes bovins femelles dans les 10 jours suivant la naissance.

Ainsi, un dosage précoce de l'hormone anti-müllérienne peut permettre d'identifier une femelle freemartin.

Il faut tout de même garder à l'esprit que si des gonades *testicule like* se sont développées au cours de la différenciation sexuelle perturbée, le taux d'AMH peut rester important.

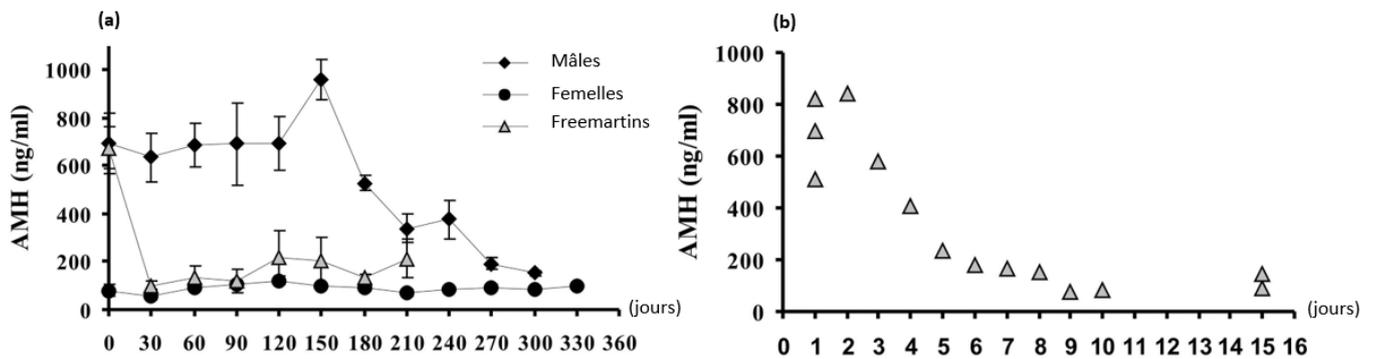


Figure 14 : Variation de la concentration en AMH au cours de la première année de vie chez les jeunes bovins

(a) Chez les mâles, femelles et free-martins

(b) Chez les free-martins

(source : ROTA *et al.*, 2002)

ii. Au cours du cycle œstral

Au cours d'un cycle ovarien, on compte généralement 2 à 4 vagues folliculaires. On peut donc se demander si cet enchainement a une influence sur la concentration en hormone anti-müllérienne, s'il existe des fluctuations concomitantes aux vagues folliculaires. Des études ont montré que la concentration en AMH est totalement indépendante de ces vagues folliculaires et reste relativement stable au cours du cycle (SOUZA *et al.*, 2015). Néanmoins, une meilleure corrélation entre la concentration en AMH et le nombre de follicules est observée au moment de l'œstrus et après le 12^{ème} jour du cycle (RICO *et al.*, 2011).

Certains travaux ont mis en évidence une légère diminution du taux d'AMH après la période d'œstrus. La concentration en AMH serait minimale entre le 4^{ème} et le 8^{ème} jour du cycle puis réaugmente progressivement jusqu'au prochain cycle (RICO *et al.*, 2011).

Si on observe une grande variation de l'activité ovarienne d'un individu à l'autre, chez un individu donné, on a une très bonne répétabilité du nombre de follicules en croissance lors des différentes vagues de maturation (BURNS *et al.*, 2005). Chaque vache a donc une activité ovarienne qui lui est propre et qui est maintenue toute sa vie.

L'étude de Souza *et al.* menée en 2015 a également permis de mettre en évidence que la concentration en AMH était indépendante du stade de lactation et de la production laitière.

Un prélèvement sanguin effectué à n'importe quel moment du cycle permet donc une bonne évaluation de la quantité moyenne d'AMH produite par les cellules ovariennes et donc de l'activité ovarienne d'un individu donné.

iii. Après la maturité sexuelle

Actuellement, très peu d'études ont porté sur le suivi de la concentration en AMH au fil des années chez les vaches. On peut cependant s'intéresser au modèle d'évolution de la femme qui est le sujet de nombreuses recherches, notamment concernant l'infertilité.

Chez la femme, l'AMH est produite à un faible taux (de l'ordre du nanogramme par millilitre de sang) de la naissance jusqu'à la puberté (LASHEN *et al.*, 2013). Des études ont montré qu'il existait un pic de sécrétion dans les premiers mois de vie puis un second un pic d'AMH avant la puberté (LEE *et al.*, 1996; TRAN *et al.*, 2011). Après la puberté, la concentration en hormone anti-müllérienne diminue progressivement. Une réduction de 30% du taux d'AMH dans les deux premières années suivant l'apparition des premiers signes de la puberté a été mise en évidence (HAGEN *et al.*, 2012).

Chez la vaches, la concentration plasmatique en AMH est plus élevée chez les veaux que chez les génisses cyclées (Batista *et al.*, 2016). On aurait donc une décroissance de la concentration dans les premiers mois de vie. Plusieurs études s'accordent à dire que la concentration en AMH reste stable après la puberté (MONNIAUX *et al.*, 2012; RICO *et al.*, 2009). Cependant, une étude a montré que le nombre de follicules antraux augmente durant les 5 premières années de la vie ce qui impliquerait une augmentation du taux d'AMH (CUSHMAN *et al.*, 2009).

Des études supplémentaires avec des effectifs plus importants et des suivis plus longs sont donc nécessaires pour avoir une idée précise de l'évolution de la concentration en AMH chez la vache adulte pour être sûr d'avoir un marqueur fiable dans le temps.

iv. En réponse à un traitement de super-ovulation

On observe une augmentation momentanée de la concentration en AMH dans les jours qui suivent l'administration de FSH (StimufolND 2 fois par jour pendant 4 jours par exemple) lors de protocoles de super-ovulation. Ceci s'explique par une augmentation du nombre de follicules antraux de petite taille dont la maturation est stimulée par la FSH (RICO *et al.*, 2009).

v. Facteurs de variation de la cinétique

Des nombreux facteurs de variation de la cinétique sont encore à l'étude. En effet, l'utilisation de l'AMH comme biomarqueur de l'activité ovarienne reste assez récente et de nombreuses interactions sont encore à éclaircir.

L'un des facteurs auquel se sont intéressées plusieurs études est le poids de l'animal. En effet, il semblerait que des variations de poids importantes, notamment des pertes de poids, seraient à l'origine d'une diminution du taux d'AMH (MONNIAUX *et al.*, 2010). De même, une balance énergétique négative (notamment en post partum) pourrait être à l'origine d'une diminution du nombre de follicules antraux et donc d'une diminution de la concentration en hormone anti-müllérienne (KENDRICK *et al.*, 1999).

L'influence de l'alimentation, a également été mise en évidence par Rico *et al.* en 2010. Dans leur étude, ils démontrent qu'un changement d'alimentation peut être à l'origine d'une diminution du taux d'AMH chez les vaches concernées.

Il existe très certainement d'autres facteurs à prendre en compte, notamment des facteurs environnementaux (mode d'élevage, conditions environnementales).

La mesure de la concentration plasmatique en AMH semble donc être une méthode prédictive simple d'évaluation du niveau d'activité ovarienne d'un individu donné. Une seule prise de sang chez la vache adulte cyclée permet d'évaluer le nombre d'ovocytes restants et donc d'avoir une idée des capacités reproductrices de l'animal.

III. L'hormone anti-Müllérienne, hormone prédictive du potentiel reproducteur

a. L'hormone anti-müllérienne, indicatrice du nombre de follicules antraux

i. Pool de follicules antraux et fertilité

Au niveau de l'ovaire, un stock de follicules primordiaux se met en place durant la vie fœtale et constitue la réserve ovarienne. Au cours des différentes vagues folliculaires, qui débutent dès la 2^{ème} semaine de vie, cette réserve diminue (DANELL, 1987; ERICKSON, 1966).

La quantité initiale de follicules primordiaux dépend de nombreux facteurs, notamment de facteurs génétiques. On a donc une grande variabilité inter individu de ce stock initial. C'est à partir de cette réserve que sont recrutés les follicules entrant dans le processus de maturation aboutissant à l'ovulation ou la majorité du temps à l'atrésie.

Le nombre de follicules antraux présents reste relativement stable chez un individu donné pendant plusieurs cycles mais présente lui aussi une très grande variabilité inter individuelle. Les facteurs influençant la quantité de follicules pré-antraux sont nombreux et pas encore tous connus mais l'implication de certains facteurs génétiques (WALSH *et al.*, 2014), de l'environnement maternel et du statut nutritionnel (IRELAND *et al.*, 2010; EVANS *et al.*, 2012) a été démontrée.

Plusieurs études ont montré que le nombre de follicules antraux est un biomarqueur phénotypique corrélé positivement avec la fonction ovarienne (IRELAND *et al.*, 2009; JIMENEZ-KRASSEL *et al.*, 2009). Cela signifie qu'un grand nombre de follicules antraux est associé à une bonne activité ovarienne. Ce nombre étant très stable chez un individu donné il est utilisé depuis longtemps pour classer les vaches selon leur potentiel reproducteur. En effet, la taille du pool de follicules antraux est positivement corrélée à la taille de la réserve ovarienne (Ireland *et al.*, 2009) mais surtout à la fertilité de la vache en question (CUSHMAN *et al.*, 2009; MOSSA *et al.*, 2012).

Dans leur étude de 2012, Mossa *et al.* démontrent que les performances reproductives sont inférieures chez une vache avec un nombre de follicules antraux réduit.

Les vaches ayant plus de 25 follicules antraux dénombrés sont gestantes à 94% à la fin de l'étude contre 84% pour les vaches présentant moins de 15 follicules antraux. De plus, l'intervalle vêlage insémination fécondante est plus court chez les vaches avec un gros pool de follicules antraux. Concernant la fertilité, les vaches présentant un nombre important de follicules antraux ont jusqu'à 3,34 fois plus de chance d'être gestantes. La moins bonne fertilité des vaches présentant moins de follicules antraux s'explique en partie par le fait qu'un faible nombre de follicules antraux est souvent associé à une faible concentration en progestérone, responsable d'une augmentation de la mortalité embryonnaire.

Au sein d'un troupeau la sélection rapide et facile des vaches avec le plus grand nombre de follicules antraux permet donc d'avoir des meilleurs résultats en matière de reproduction.

Il a par ailleurs été mis en évidence que les vaches présentant un nombre réduit de follicules antraux répondent moins bien aux traitements de super-ovulation (IRELAND *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2004). Cette hypothèse renforce encore le fait qu'il semble très intéressant d'évaluer l'activité ovarienne des vaches avant de les mettre à la reproduction afin d'optimiser les résultats et ainsi limiter les pertes de temps et d'argent.

ii. *Corrélation AMH nombre de follicules antraux*

La découverte de l'implication de l'hormone anti-müllérienne dans la régulation de l'activité ovarienne a permis d'envisager de nouvelles applications quant à son utilisation dans la conduite d'élevage, notamment dans la gestion de la mise à la reproduction. En effet, l'AMH est produite uniquement par les follicules en maturation, ce qui en fait donc un marqueur de choix de l'activité ovarienne. Nous avons vu que l'évaluation du nombre de follicules antraux est utilisée depuis longtemps pour connaître l'activité ovarienne d'une vache donnée. Ainsi, les premiers travaux ont eu pour objectifs de démontrer une éventuelle corrélation entre le taux d'hormone anti-müllérienne présent et le nombre de follicules.

Le lien entre la concentration en AMH et le pool de follicules antraux a d'abord été étudié chez la souris (DURLINGER *et al.*, 2002) puis chez la femme (FANCHIN *et al.*, 2003) ; une corrélation positive avait alors été mise en évidence.

Plus récemment, plusieurs études ont montré qu'une mesure d'AMH faite pendant un cycle sur une vache donnée est un bon indicateur du nombre de follicules antraux présents dans l'ovaire au cours du cycle (IRELAND *et al.*, 2010). On observe, donc chez la vache également, une corrélation positive entre la concentration en AMH plasmatique et le nombre de follicules antraux.

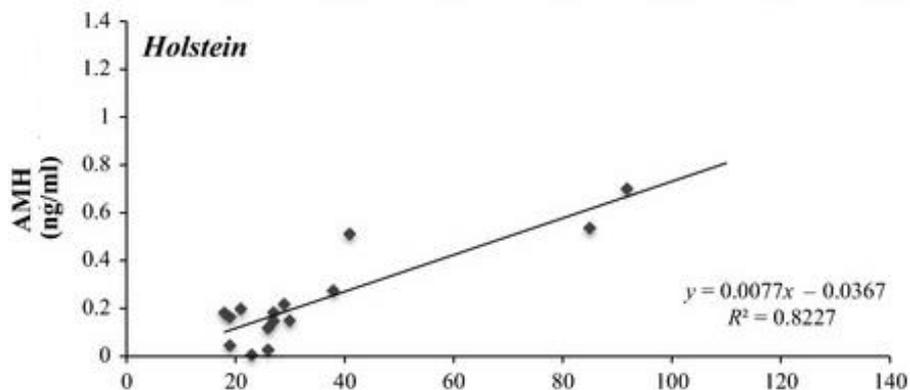


Figure 15 : Corrélation entre la concentration en AMH et le nombre de follicules antraux
(source : BALDRIGHI *et al.*, 2014)

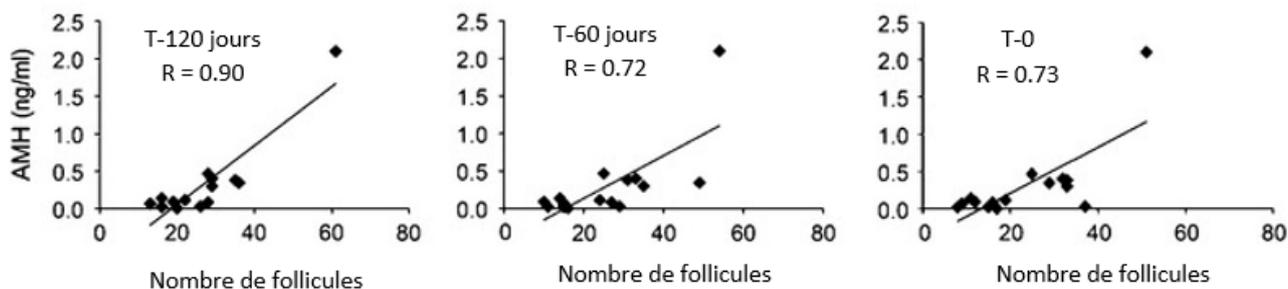


Figure 16 : Corrélation entre le nombre de follicules comptés et une valeur unique de la concentration plasmatique en AMH
(source : BATISTA et al., 2014)

Sur la figure précédente (figure 14), nous pouvons voir qu'une valeur de la concentration en AMH à un moment donné est un bon indicateur du nombre de follicules présents jusqu'à 120 jours précédant le prélèvement.

La concentration plasmatique en AMH est donc un bon indicateur de l'activité ovarienne chez la vache. Elle semble intéressante pour prédire rapidement et de façon fiable la fertilité d'une vache donnée.

b. Exploitation de l'AMH dans le cadre du transfert d'embryon

En espèce bovine, le transfert embryonnaire est un outil de choix pour l'accélération du progrès génétique et sa diffusion nationale et internationale. Plus de 500 000 embryons sont produits annuellement dans le monde. Actuellement, plus de 98% de ces embryons sont produits *in vivo* dans les cadres des programmes *multiple ovulation and embryo transfert* (MOET). La production d'embryons nécessite, après administration d'un traitement de super-ovulation sur des vaches « donneuse », d'effectuer une insémination artificielle, puis de récupérer les embryons avant leur implantation par lavage (ou *flushing*) des voies génitales. Deux limitations majeures freinent encore l'usage du transfert embryonnaire : environ 20 % des vaches ne produisent aucun embryon transférable et parmi les femelles donnant des embryons, le taux de production est très variable (2 à 50) entre femelles (BO et MAPLETOFT, 2014; HASLER, 2014). L'absence de prévision de la capacité d'une femelle à produire des embryons engendre des coûts supplémentaires dans la conduite des schémas de sélection (déplacements et mobilisation des techniciens).

Il existe effectivement une grande variabilité entre les différentes donneuses par rapport au nombre d'ovulations et au nombre d'embryons produits après les traitements de super-ovulation. Elle s'explique premièrement par la différence d'activité ovarienne entre les donneuses et de leur réponse aux traitements de super-ovulation. Les autres étapes déterminantes pour la production d'embryons concernent la survie des ovocytes dans l'oviducte, le transit et la survie des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles après insémination, la fécondation et le développement des embryons jusqu'au stade morula ou blastocyste (MONNIAUX et al., 2010). Il est donc important de garder en tête que le nombre d'embryons transférables récupérés sur un animal après super-ovulation dans le cadre d'un transfert d'embryon ne reflète pas forcément le nombre d'ovulations. Néanmoins, cette variabilité peut entraîner des

coûts supplémentaires non négligeables, il est donc important de pouvoir se servir de tous les outils nous permettant de cibler les « meilleures donneuses ».

Historiquement, la seule façon de repérer à l'avance les « bonnes donneuses » potentielles au sein d'un troupeau était de réaliser un comptage des follicules antraux par échographie. Ce comptage nécessite un matériel coûteux et des techniciens compétents. La mise en évidence d'une corrélation positive entre la concentration plasmatique en AMH et le nombre de follicules antraux présents permet d'envisager l'AMH comme un nouveau marqueur permettant d'évaluer simplement la capacité de production d'embryons d'une donneuse potentielle.

La production d'embryons en grand nombre repose également sur l'administration de traitements permettant une super-ovulation. Il faut donc à la fois sélectionner les vaches qui répondront le mieux aux traitements et qui produiront le plus d'embryons viables.

i. Réponse aux traitements de super-ovulation

En médecine humaine, l'AMH est dosée lors d'exploration de l'infertilité chez la femme. Des études ont montré qu'une valeur de concentration en AMH en dessous de 1ng/mL prédit une mauvaise réponse de la patiente à un traitement de stimulation aux gonadotropines.

L'hormone anti-müllérienne est un bon marqueur endocrinien de la folliculogénèse basale et en particulier de la population de petits follicules à antrum. Or, cette population est précisément la population cible des traitements de stimulation ovarienne utilisant des hormones gonadotropes. Il est donc intéressant de connaître le niveau d'activité de cette population avant de commencer un traitement de super-ovulation.

Les premières études portant sur le lien entre le taux d'AMH et la réponse après stimulation à la FSH ont permis de mettre en évidence une forte corrélation entre la concentration plasmatique en AMH et le nombre de follicules produits après stimulation et le nombre de corps jaunes visualisables après l'ovulation (RICO *et al.*, 2012, 2009).

Dans une étude réalisée en 2010, Monniaux *et al.* mettent en évidence une très bonne répétabilité et une bonne héritabilité du nombre d'embryons produits après stimulation ovarienne chez une vache donnée.

Cependant, toutes les études précédemment citées portent sur des vaches hors lactation. Une étude a donc été réalisée sur des vaches de race Prim Holstein en lactation. Elle a mis en évidence une corrélation positive entre la concentration en hormone anti-müllérienne et le nombre d'embryons produits et le nombre de corps jaunes observés (SOUZA *et al.*, 2015). Cette étude a démontré que les vaches avec une concentration en AMH inférieure à 90 pg/mL (sur sang hépariné) ou 130 pg/mL (sur tube EDTA) donnent moins de 10 embryons (moins de 15 corps jaunes) après traitement de super-ovulation.

Ainsi, la mesure de la concentration en hormone anti-müllérienne permet de prédire la réponse d'une potentielle donneuse au protocole de super-ovulation. Ceci permet de concentrer ses efforts et son argent sur les animaux avec le meilleur potentiel.

ii. Production d'embryons viables

En plus d'une bonne réponse au traitement de super-ovulation, il faut également que les embryons produits soient viables. Des recherches ont donc été faites pour trouver un éventuel lien entre la concentration en AMH et la quantité d'embryons transférables produits par les donneuses.

Dans une étude en 2010, Monniaux et al. ont mené une étude rétrospective sur 45 vaches croisées Holstein Normande soumises à 240 collectes d'embryons. Ils ont mis en évidence une bonne répétabilité individuelle du nombre d'embryons collectés et du nombre d'embryons transférables mais également l'existence d'un effet « père des donneuses d'embryons » très significatif sur ces paramètres. De plus, les vaches ayant produit le plus d'embryons sont celles dont la concentration en AMH était la plus élevée : les vaches ayant une capacité à produire plus de dix embryons transférables par collecte avaient des concentrations plasmatiques d'AMH deux fois plus élevées en moyenne que les vaches à plus faible capacité. On a donc une corrélation positive entre la concentration en AMH et le nombre d'embryons transférables. D'autres études ont par la suite confirmé cette hypothèse (HIRAYAMA *et al.*, 2012).

Ainsi, une simple mesure de la concentration en AMH constitue une méthode prédictive simple d'évaluation de la capacité de production d'un nombre élevé, ou faible, d'embryons transférables par une donneuse potentielle. Cependant, l'héritabilité du nombre d'embryons transférables est plus faible que celle du nombre d'embryons produits, suggérant un rôle important des facteurs environnementaux (dont les mécanismes sous-jacents restent mal connus) dans le déterminisme de la qualité embryonnaire (HIRAYAMA *et al.*, 2012).

Les conditions optimales pour la réalisation de cette mesure en élevage restent encore à définir. En particulier, il est indispensable d'évaluer l'incidence de facteurs, tels que l'âge de l'animal, sa race, son état physiologique (cycle, lactation ou anœstrus post partum...) et celle des conditions environnementales (alimentation, saison) sur la fiabilité d'une telle mesure.

c. Utilisation de l'AMH comme marqueur phénotypique du potentiel reproducteur

i. Hormone anti-müllérienne et productivité

Il est admis qu'une mesure phénotypique de l'ovaire (taille de l'ovaire, taille de la réserve ovarienne...) est un bon indicateur des performances de reproduction chez la vache laitière. Historiquement, cette évaluation se faisait principalement par échographie. Cependant depuis la découverte de l'implication de l'hormone anti-müllérienne dans le maintien du pool folliculaire, d'autres alternatives sont envisageables. Par exemple, la mesure de la concentration en hormone anti-müllérienne permet d'avoir une idée précise de l'activité ovarienne. Cette activité est très variable d'un individu à l'autre. Ainsi, au sein d'un troupeau, les concentrations en AMH peuvent être très variables parmi des individus de la même tranche d'âge. On peut donc se demander s'il existe une corrélation entre ces variations inter-individuelles et la longévité au sein du troupeau, notamment du point de vue de la reproduction.

Récemment, un groupe d'étude s'est penché sur la relation entre la concentration en hormone anti-müllérienne, mesurée sur des génisses (âgées de 11 à 15 mois) et leur longévité dans le troupeau ainsi que leur productivité (JIMENEZ KRASSEL *et al.*, 2015). Les génisses ont été suivies quotidiennement pendant environ 4 ans. Elles ont été classées en 4 groupes, selon leur taux d'AMH : Q1 (6,2 à 30 pg/mL d'AMH), Q2 (30,1 à 56 pg/mL), Q3 (56,1 à 85 pg/mL) et Q4 (85,7 à 432 pg/mL). On a donc ici encore une illustration concrète de la grande variabilité du taux d'AMH entre des individus appartenant à une même tranche d'âge.

À la fin de cette étude, on a pu mettre en évidence un taux de réforme plus rapide pour les vaches appartenant à Q1 (196 jours plus tôt en moyenne) associé à un nombre de lactation moins important (1,9 pour les individus de Q1 contre 2,6 pour ceux de Q4). On a également une production lactée moins importante lors de la première lactation et un nombre de vaches pleines moins important parmi les vaches de Q1. On rapporte aussi une mortalité plus élevée du premier veau chez les vaches ayant un faible taux d'AMH. De plus, les causes de réformes concernant les performances reproductrices (nombres d'insémination supérieur à 4, présence de kystes ovariens, avortement) sont plus fréquentes chez les individus avec une faible concentration en AMH. Les génisses présentant un faible taux d'AMH ont donc une longévité plus courte au sein d'un troupeau. Ceci s'explique principalement par des mauvaises performances reproductrices.

Les vaches ayant un faible taux d'AMH présentent donc une fertilité limitée entraînant un taux de réforme important.

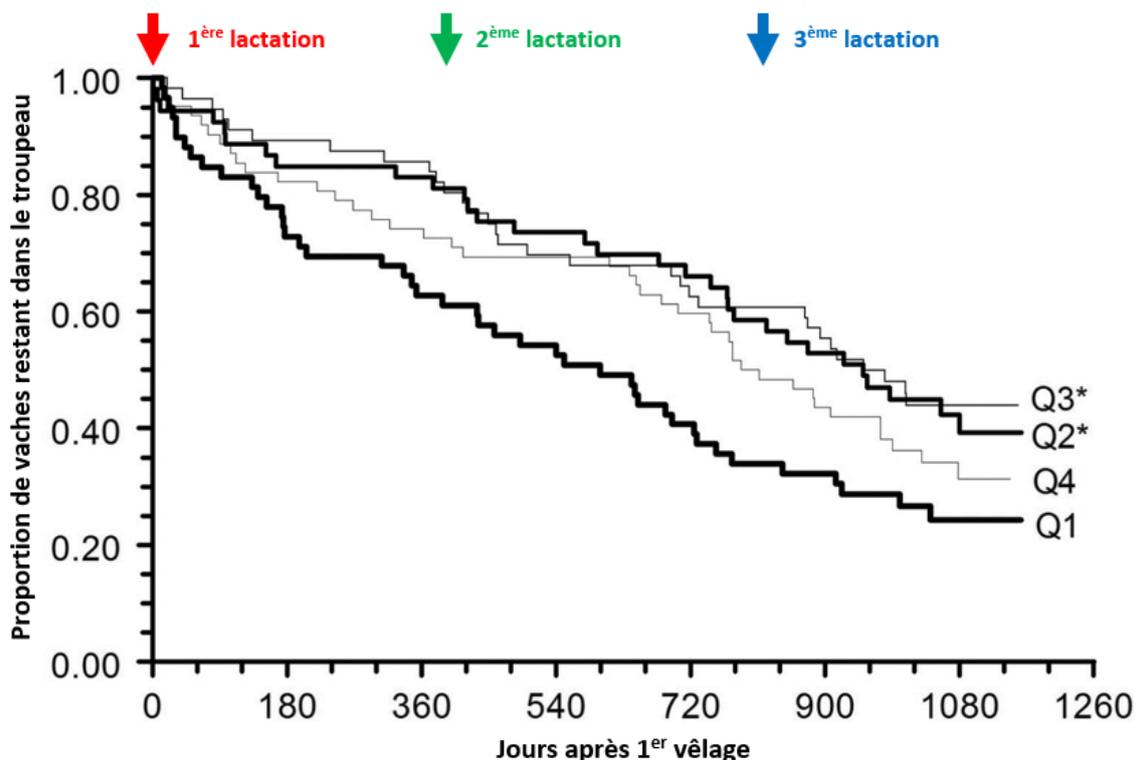


Figure 17 : Longévité des vaches laitières au sein d'un troupeau selon leur concentration en AMH

Q1 : [AMH] < 30 pg/mL
 Q2 : 30,1 < [AMH] < 56 pg/mL
 Q3 : 56,1 < [AMH] < 85 pg/mL
 Q4 : [AMH] > 85,1 pg/mL

(source : JIMENEZ-KRASSEL *et al.*, 2015)

D'autres études ont également permis de mettre en évidence une corrélation positive entre la concentration en AMH et la fertilité d'une vache donnée (IRELAND *et al.*, 2010; MOSSA *et al.*, 2012) : le nombre d'inséminations nécessaires est moins élevé et l'intervalle vêlage-vêlage est plus court chez les vaches présentant des concentrations hautes en AMH.

Ainsi, une seule mesure d'AMH sur des génisses pourrait donc prédire la longévité de ces dernières au sein du troupeau et surtout de sélectionner les génisses les plus fertiles.

Cette découverte offre des opportunités économiques importantes. Si on considère que le gain mensuel par vache laitière varie entre 20 et 30€ (COLE et VAN RADEN, 2009). Si dans l'étude précédente, on remplace chaque génisse appartenant à Q1 par une génisse des 3 autres groupes, on augmente sa longévité au sein du troupeau de 172 jours ce qui correspond à un gain de 117 à 171€ par animal. Sélectionner les meilleures futures reproductrices en se basant sur la concentration en AMH est donc intéressant autant d'un point de vue génétique que d'un point de vue économique.

ii. Héritabilité des paramètres de fertilité

La sélection génétique des vaches laitières ayant une production lactée plus importante a souvent été faite au dépend de la fertilité qui est passée de 65% à 30% (WALSH *et al.*, 2011). Il existe donc une corrélation négative entre la valeur génétique concernant la production laitière et celle concernant la fertilité.

Depuis quelques années, de nombreuses études cherchent donc à déterminer quels marqueurs possédant une héritabilité suffisante pourraient être utilisés pour sélectionner les meilleurs reproducteurs (mâle et femelle). Cependant, l'héritabilité des paramètres de fertilité évalués traditionnellement (tels que l'intervalle vêlage-vêlage, l'âge du 1^{er} vêlage, le nombre d'inséminations nécessaires...) est très souvent inférieure à 5% (Cammack *et al.*, 2009; Pryce and Veerkamp, 2001). Chez la vache laitière, la majorité des capacités reproductrices ont une héritabilité faible variant de 0,02 à 0,04 (Berry *et al.*, 2014). De nombreuses recherches sont donc menées pour essayer de trouver de nouveaux paramètres évaluables facilement et ayant une héritabilité plus forte.

L'étude de Walsh *et al.* en 2014 a mis en évidence que le nombre de follicules antraux présente une héritabilité de $0,31 \pm 0,14$ chez les adultes, $0,25 \pm 0,13$ chez les génisses, ce qui fait de lui un facteur très intéressant. Le nombre de follicules antraux est donc un critère génétique d'héritabilité moyenne. Chez le nouveau-né, il est influencé par l'âge de la mère, sa concentration en AMH, son statut physiologique (en lactation ou hors lactation) et la qualité du lait produit (notamment avec le taux de matière grasse). Ainsi, les mères donnant les veaux avec le plus grand nombre de follicules antraux sont celles ayant une forte concentration en AMH.

Une mesure de la concentration en AMH peut donc permettre d'identifier à la fois les animaux les plus fertiles mais également les animaux dont les descendants seront eux-mêmes plus fertiles. La recherche de marqueurs génétiques associés à l'AMH permettrait par exemple de sélectionner les taureaux capables de donner les génisses les plus fertiles.

d. Exploitation de l'AMH dans le cadre de la fécondation *in vitro*

i. *Chez les vaches adultes cyclées*

Depuis une dizaine d'années, la fécondation *in vitro* est une procédure de plus en plus abordable permettant d'augmenter le gain génétique dans le cadre de la reproduction de nos vaches laitières. De nombreuses études ont donc pour objectif de trouver des marqueurs permettant d'augmenter le rendement économique et génétique de cette technique. En effet, les coûts engagés restent importants pour des résultats plus ou moins prédictibles.

Il a été démontré que la concentration en AMH était un bon marqueur prédictif pour la production *in vivo* d'embryons suite à des traitements de super-ovulation (MONNIAUX *et al.*, 2010; RICO *et al.*, 2012). Il est donc totalement légitime de se demander si cette observation peut se retrouver lors des procédures de reproduction *in vitro*.

Plusieurs études ont réussi à montrer une corrélation positive entre la concentration en hormone anti-müllérienne et le nombre d'ovocytes aspirés chez des vaches cyclées en vue d'une fécondation *in vitro* (GUERREIRO *et al.*, 2014; VERNUNFT *et al.*, 2015). Cependant, ces études s'accordent à dire qu'il n'existe pas de lien direct entre la concentration en hormone anti-müllérienne et le nombre d'embryons viables produits *in vitro*. En effet, le taux de blastocytes observés est indépendant du taux d'AMH. L'hormone anti-müllérienne constitue donc un indicateur quantitatif uniquement.

D'autres études ont confirmé cette hypothèse, l'hormone anti-müllérienne est un indicateur du nombre d'ovocytes collectables mais aucunement du nombre d'ovocytes viables (IRELAND *et al.*, 2007; SILVA SANTOS *et al.*, 2014). Les facteurs impliqués dans la maturation des embryons sont très nombreux (stade de lactation, maturité sexuelle) et ne peuvent être réduit à l'influence de la concentration en AMH seule.

Cependant, une seule prise de sang, réalisée avant tout protocole de synchronisation ou de super-ovulation permet de définir quelles sont les bonnes donneuses et les mauvaises donneuses. Ceci présente un avantage économique non négligeable, on peut ainsi concentrer son temps et son argent sur les animaux dont le rendement sera le plus avantageux.

ii. *Chez les veaux*

Les jeunes bovins femelles possèdent plus de follicules antraux que les vaches cyclées. Ainsi, leur potentiel reproducteur peut paraître meilleur. L'utilisation de veaux comme donneurs d'ovocytes (BETTERIDGE *et al.*, 1989) est un point stratégique important pour accélérer le gain génétique en diminuant l'intervalle entre deux générations. Cependant, elle nécessite forcément une stimulation par des gonadotropines car l'ovaire des jeunes génisses n'est pas encore mature et les follicules pré antraux sont peu sensibles. De plus, la collecte des ovocytes ne peut pas se faire par voie trans-vaginale et doit être réalisée sous laparoscopie. Les coûts engendrés sont donc importants et la découverte d'un marqueur prédictif fiable quant à la capacité reproductrice serait une avancée majeure.

Dans leur étude de 2016, Batista *et al.* se sont penchés sur la corrélation entre la concentration en hormone anti-müllérienne et les paramètres quantitatifs et qualitatifs des procédures de fécondation *in vitro* chez des jeunes bovins femelles âgées de 2 à 4 mois. Ils ont trouvé une corrélation positive forte entre le taux d'AMH des veaux et les paramètres quantitatifs mais pas de lien direct entre ce taux et la viabilité des ovocytes.

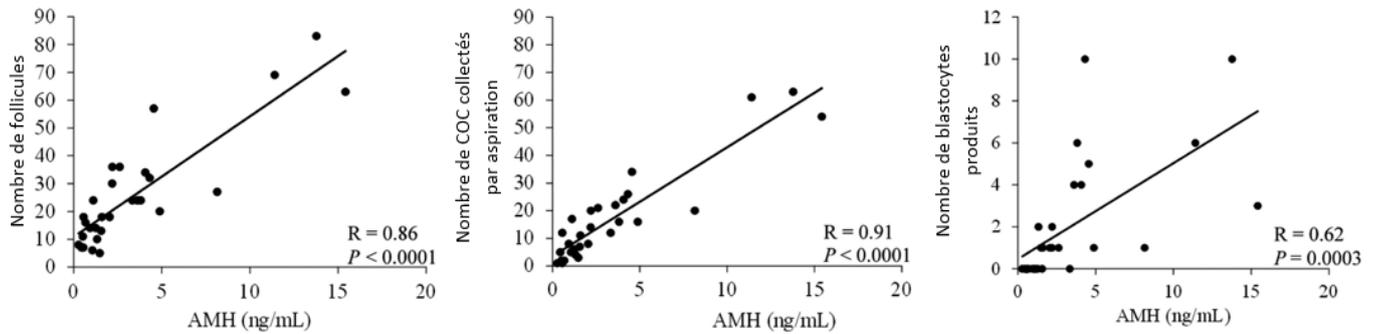


Figure 18 : Corrélation entre la concentration en AMH et différents marqueurs d'efficacité de la fécondation *in vitro*
(source : BATISTA *et al.* 2016)

Pour conclure, nous pouvons donc dire que la découverte de l'hormone anti-müllérienne comme indicateur du nombre de follicules antraux a permis d'envisager son utilisation en pratique courante dans le cadre de la gestion de la mise à la reproduction. Mais, le manque de connaissances précises quant à l'interaction de cette hormone sur les phénomènes d'acquisition de compétence de l'ovocyte constitue une limite pour son utilisation dans les procédures de fécondation *in vitro*. Sa corrélation positive forte avec les paramètres quantitatifs de la reproduction, le plus important étant le nombre d'embryons produits, en fait une piste très intéressante à développer.

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

Cette étude est une étude expérimentale analytique qui a été menée en Rhône Alpes Auvergne (Loire et Rhône) entre le 1^{er} Octobre 2017 et le 31 Octobre 2018.

I. Objectifs

Chez la femelle, l'hormone anti-müllérienne est produite par les cellules de la granulosa des follicules ovariens en cours de maturation et non atreétiques. Identifiée initialement chez la souris, elle a été retrouvée chez de nombreuses espèces de mammifères incluant la femme, la vache et la brebis (TAKAHASHI *et al.*, 1986a; VIGIER *et al.*, 1984a).

La sécrétion de l'AMH est initiée dès le recrutement du follicule et atteint les concentrations les plus élevées dans les follicules pré-antraux et les petits follicules antraux. Une fraction de cette concentration folliculaire s'échappe et permet de donner des concentrations sanguines significatives. L'AMH exerce un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules de la granulosa, sur l'expression de l'aromatase et du récepteur FSH-LH dépendant réduisant de fait la sensibilité des follicules pré-antraux et des petits follicules antraux à la FSH et à la dépendance hypophysaire (DURLINGER *et al.*, 2001). L'AMH est également un régulateur des premières phases de croissance des follicules exerçant une puissante inhibition sur le recrutement des follicules primordiaux dans le pool des follicules engagés (DURLINGER *et al.*, 2002, 1999) limitant ainsi le nombre de follicules susceptibles d'atteindre un stade pré-ovulatoire.

L'AMH trouve ainsi de nombreuses applications cliniques en reproduction humaine et principalement comme un témoin plasmatique de la réserve ovarienne de la femme. Compte tenu de ses fonctions multiples dans la physiologie ovarienne et de la nécessité de pouvoir disposer d'outils pertinents et accessibles pour évaluer la fertilité des espèces animales de production, l'AMH est un candidat marqueur prometteur.

L'objectif de cette étude était d'évaluer, à partir d'un kit R&D de dosage d'AMH bovine en cours de développement par la société bioMérieux, les concentrations plasmatiques retrouvées dans deux races bovines. L'une est une race de production de lait (la Prim'Holstein) et l'autre de production de viande (race Charolaise).

L'objectif est de s'intéresser :

- aux variations physiologiques des concentrations plasmatiques en AMH que l'on pouvait rencontrer chez ces deux espèces au cours de leur vie économique.
- aux facteurs pouvant affecter la concentration plasmatique en s'intéressant plus particulièrement à l'influence du cycle ovarien.
- enfin une approche de la variation chez le jeune a été initiée afin de pouvoir supporter une éventuelle utilisation.

L'ensemble de ces éléments permettent d'apporter un éclairage sur la possibilité de l'utilisation de ce marqueur plasmatique afin d'évaluation de la fertilité chez les bovins. Au final, l'AMH plasmatique pourrait être un outil dans la gestion de la reproduction des vaches laitières afin d'améliorer la productivité, notamment en matière de reproduction afin de détecter précocément les futures bonnes reproductrices et aider à la conduite du renouvellement du troupeau.

I. Matériel et méthodes

a. Animaux et protocoles de suivi

Dans cette étude, plusieurs lots d'animaux ont été suivis et prélevés, selon l'objectif visé.

i. Vaches adultes cyclées

Pour déterminer la cinétique de l'hormone anti-Müllérienne après la puberté, nous avons choisi de réduire notre étude à 2 races présentes en France : la race Holstein et la race Charolaise.

Ainsi, 141 vaches de race Holstein ont été incluses dans cette étude. Les animaux proviennent de deux élevages laitiers, l'un situé dans la Loire et l'autre situé dans le Puy de Dôme. Ces deux élevages sont représentatifs des systèmes de production de lait de moyenne montagne en France. La base annuelle de production de lait est 8 000 L par an.

Le nombre total de vaches Holstein incluses dans l'étude est respectivement de 83 pour l'élevage de la Loire et de 58 pour l'élevage auvergnat. Les vaches étaient âgées de 1 an à 9 ans.

De même, 153 vaches de race Charolaises, issues de 3 élevages situés dans la Rhône, ont été utilisées comme représentatives de la race. Le nombre de vaches incluses dans l'étude pour chaque élevage a été respectivement de 34, 57 et 62 vaches. Elles étaient âgées de 1 à 14 ans.

Sur chacune de ces vaches, un dosage ponctuel de l'hormone anti-müllérienne a été réalisé et mis en relation avec l'âge de l'animal.

ii. Génisses Holstein prépubères

Pour les études de cinétique de l'AMH chez la jeune génisse, des prélèvements ont été réalisés sur des vaches de race Holstein entre la naissance et la puberté. Afin de suivre l'évolution plasmatique dans le temps pendant la croissance de la vache, un prélèvement mensuel a été réalisé sur un lot de génisses de race Holstein.

Toutes ces génisses étaient issues du même élevage et donc élevées dans les mêmes conditions. Elles sont nées entre Octobre 2017 et Janvier 2018. Elles sont issues de mères n'ayant pas de troubles de la reproduction.

iii. Influence du cycle ovarien chez des vaches adultes

Pour évaluer l'influence du cycle ovarien sur la concentration plasmatique de la vache, 4 vaches de race Holstein et Montbéliarde âgées de 4 à 11 ans ont été suivies pendant plus d'un mois. Un examen échographique préalable a été effectué sur chacune des 4 vaches pour vérifier l'absence d'éléments pouvant perturber le cycle.

Pour chacune des 4 vaches, deux dosages hebdomadaires de la concentration en AMH est réalisé sur une période d'un mois, associé à un dosage de progestérone et d'œstradiol pour positionner le cycle.

b. Dosages effectués

i. Prélèvements de sang

Le sang des vaches adultes a été prélevé à la veine coccygienne par ponction avec une aiguille montée sur un Vacutainer® et collecté dans un tube sec.

Le sang des génisses a été prélevé à la veine jugulaire par ponction avec une aiguille montée sur un Vacutainer® et collecté dans un tube sec.

Les tubes ont immédiatement été placés après le prélèvement dans un contenant isotherme avant d'être réfrigérés en attendant leur centrifugation.

Dans les 24 à 36 heures suivant le prélèvement, les tubes secs ont été centrifugés à 800 g pendant 10 minutes. Puis, le sérum a été prélevé et dosé immédiatement pour en déterminer la concentration en AMH et en progestérone. Une fraction a été congelée pour une détermination ultérieure de la concentration en œstradiol.

ii. Dosage de la progestérone plasmatique

La détermination de la concentration en progestérone a été réalisée à partir d'un automate d'exploration clinique (Immulite, Siemens Healthcare, Erlangen, Allemagne). Sur le principe, il s'agit d'un immuno-dosage enzymatique en chimioluminescence (CLEIA) sur support solide à partir de kits pour dosages cliniques. Le dosage est un dosage en compétition assurée par de la progestérone couplée à une phosphatase alcaline. La sensibilité analytique est de 0.1 ng/mL (0.3 nmol/L), avec une précision de 7.0%-10.2% en intra-essai, et de 9.5-21.7% en inter-essai.

iii. Dosage de la concentration plasmatique en 17β-œstradiol

La détermination de la concentration en 17β-œstradiol a été réalisée à partir d'un dosage radio-immunologique (Ultrasensitive œstradiol RIA, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Il s'agit d'un dosage par compétition à l'aide d'une molécule d'œstradiol couplée à de l'iode 125. La calibration est assurée par une gamme d'œstradiol en sérum humain. La sensibilité analytique est de 2.2 pg/mL (8 pmol/L) avec une précision intra-essai inférieure à 8.9%, et inter-essai inférieure à 12.2%.

iv. Dosage de l'hormone anti-müllérienne

La détermination de la concentration plasmatique en AMH a été réalisée à partir d'un kit de dosage « bovine AMH » actuellement en développement R&D par la société bioMérieux pour une adaptation sur la plateforme de dosage Vidas®. Les premiers lots produits ont gracieusement été mis à la disposition de VetAgro Sup pour la réalisation de ce travail.

Le dosage est un immunodosage basé sur deux anticorps spécifiques dirigés contre l'AMH bovine. Le principe du dosage est basé sur le couplage d'un anticorps sur un cône réactionnel permettant le prélèvement de l'échantillon et la capture de l'AMH dans l'échantillon prélevé. La révélation est assurée par un second anticorps couplé à une phosphatase alcaline générant un substrat fluorescent. La cinétique de réponse assure une précision analytique jusqu'à une concentration de 3000 pg/mL, avec un domaine de linéarité de 3,0 ou 6,2 pg/mL (selon les lots) à 3074,4 ou 3450,3 pg/mL. La LOQ est de 13,6 pg/mL, la LOD de 11,5 pg/mL.

Les variations intra-essais sont de 2,3 à 3,2% dans le domaine de mesure 50-3000 pg/mL et inter-essais de 4,2 à 10,3% dans le domaine de mesure de 50 à 3000 pg/mL.

c. Analyses des données

Les analyses statistiques ont été réalisées sous Prism®. Les tests utilisés sont rapportés dans les légendes des figures correspondantes.

II. Résultats

a. Evolution de la concentration sérique en AMH chez des bovins adultes en fonction de l'âge

La concentration sérique en AMH a été suivie sur des bovins de race Holstein et de race Charolaise par un prélèvement unique réalisé sur des animaux de différents âges. Ces animaux faisaient partie soit du renouvellement de troupeau soit étaient en production.

La répartition par âge de la concentration sérique chez les vaches Holstein est représentée dans la figure 19.

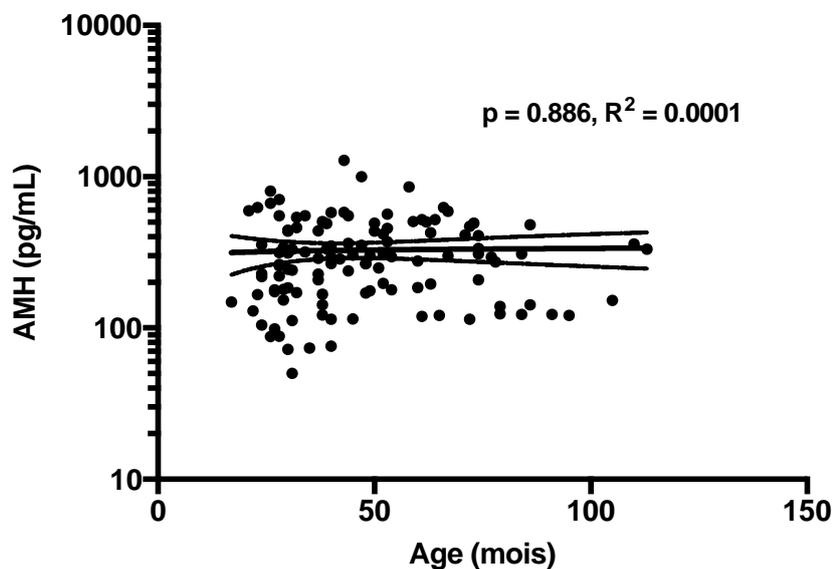


Figure 19 : Evolution de la concentration en hormone anti-Müllérienne chez les vaches Holstein âgées de plus de 17 mois (n = 120)

Une corrélation de Pearson associée à une représentation de l'intervalle de confiance 95% est reportée sur la figure

La concentration sérique de ce groupe de vaches en renouvellement ou en production s'échelonne de 50 à 1284 pg/mL avec une moyenne \pm SD égale à 326.2 ± 202.3 pg/mL (IC50% = 289.6 – 362.8 pg/mL).

L'évolution de la concentration avec l'âge ne montre pas de corrélation entre l'âge et la concentration. De plus, la régression non linéaire ne montre pas de diminution de la concentration pendant la durée de production économique de la vache (pente = 26.72 ; IC50 = -174 - 228) laissant davantage considérer l'évolution comme constante. Toutefois, un regroupement des animaux de plus de 5 ans a montré une concentration en AMH significativement plus basse par rapport à des animaux plus jeunes ($p = 0.023$, Figure 22).

La répartition visuelle de la distribution des concentrations sériques en AMH apparaissait néanmoins différente entre les animaux jeunes (< 50 mois) et les animaux

plus âgés (> 50 mois). Il apparaissait sur la figure une diminution de la représentation des animaux présentant les écarts les plus importants en AMH (écartement apparent des valeurs élevées et des valeurs basses). Une analyse de contingence de la répartition globale par quartile entre les animaux de moins de 50 mois et ceux de plus n'avait toutefois pas permis de mettre en évidence une différence statistique ($p = 0.1181$).

Une approche équivalente a été réalisée sur des vaches de race charolaise, sélectionnées principalement pour leur masse musculaire. Une analyse menée sur 152 vaches de plus de 1 an est représentée dans la figure 20.

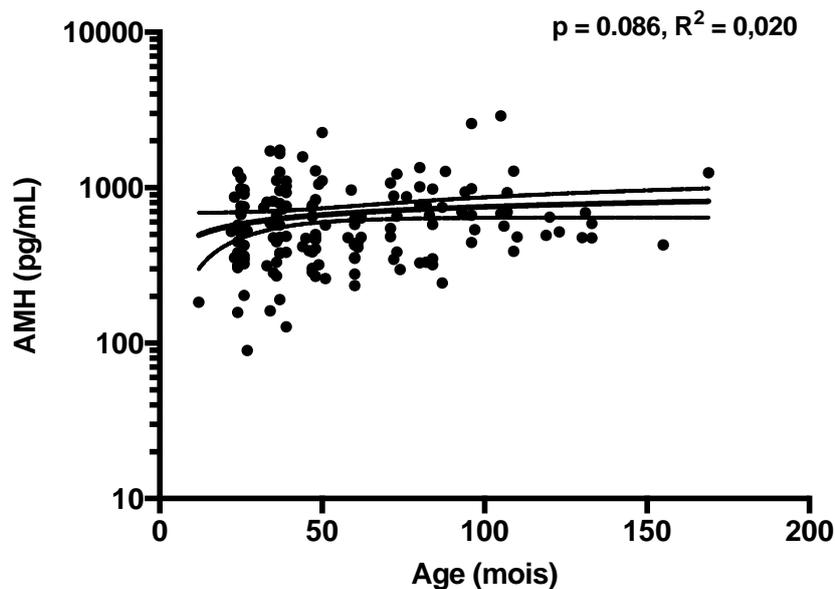


Figure 20 : Evolution de la concentration en hormone anti-Müllérienne chez les vaches Charolaises âgées de plus de 12 mois (n = 152)

Une corrélation de Pearson associée à une représentation de l'intervalle de confiance 95% est reportée sur la figure

La concentration en AMH rencontrée chez les vaches de race Charolaise présentait une concentration moyenne de 667.5 ± 431.5 pg/mL avec intervalle de confiance IC95 = 598.6 – 736.4 pg/mL.

L'évolution de la concentration en fonction de l'âge de l'animal n'a pas montré d'influence notable du vieillissement de l'animal sur la concentration en AMH. En effet, avec une pente de 281.3 (IC50 = -16.41 - 578.9 pg/mL). En tout état de cause, il n'a pas été constaté de tendance à la diminution sur la plage d'âge observée soit 14 ans.

De même que pour la race Holstein, la distribution de la concentration en AMH apparaissait plus restreinte sur les âges plus élevés que sur les plus jeunes animaux mais la tendance à la disparition des extrêmes n'a pas pu être mise en évidence. En effet, la distribution des quartiles des animaux de moins de 50 mois n'apparaissait pas statistiquement différente de celle des animaux de moins de 50 mois ($p = 0.3046$).

La figure 21 illustre la répartition cumulée entre les deux races bovines. Il apparaît que les deux races présentent des concentrations moyennes en AMH profondément différentes.

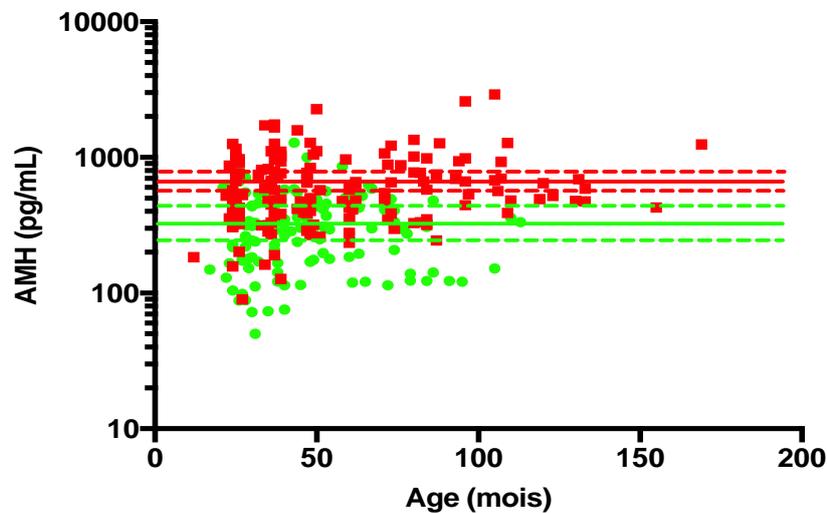


Figure 21 : Représentation des concentrations cumulées d'AMH dans la Holstein (●) et la race Charolaise (■) en fonction de l'âge

En vert : distribution des concentrations rencontrées chez les vaches Holstein ; en rouge chez les vaches Charolaises (la moyenne et l'IC95 sont représentés pour chacune des races)

Une comparaison entre les concentrations en AMH des deux races confondues est représentée dans la Figure 22. Il apparaît très clairement que la concentration en AMH chez la vache Charolaise est nettement plus élevée que chez la race Holstein. Cette observation laisse envisager des variations de concentration en AMH qui peuvent être importantes d'une race à l'autre.

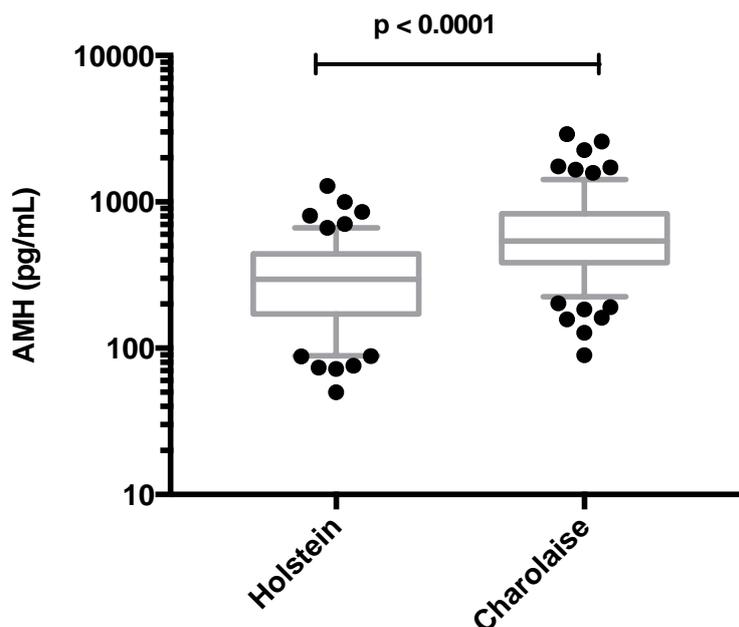


Figure 22 : Comparaison des concentrations en AMH des deux races étudiées

La différence de concentrations en AMH dans le sérum a été évaluée par tranche d'âge économique basée sur la contrainte physiologique la plus importante à savoir celle imposée aux races de production lactée. Une répartition par classe d'âge est proposée dans la Figure 22. Les tranches d'âge ont été définies comme celle correspondant au renouvellement du troupe (âge = 1 et 2 ans) ; aux animaux en pleine production (âge = 3 à 5 ans) et les animaux de plus de 5 ans.

Chaque tranche d'âge était très significativement différente entre la race Holstein et la race Charolaise ($p < 0.0001$) avec une concentration plus élevée pour la race à viande.

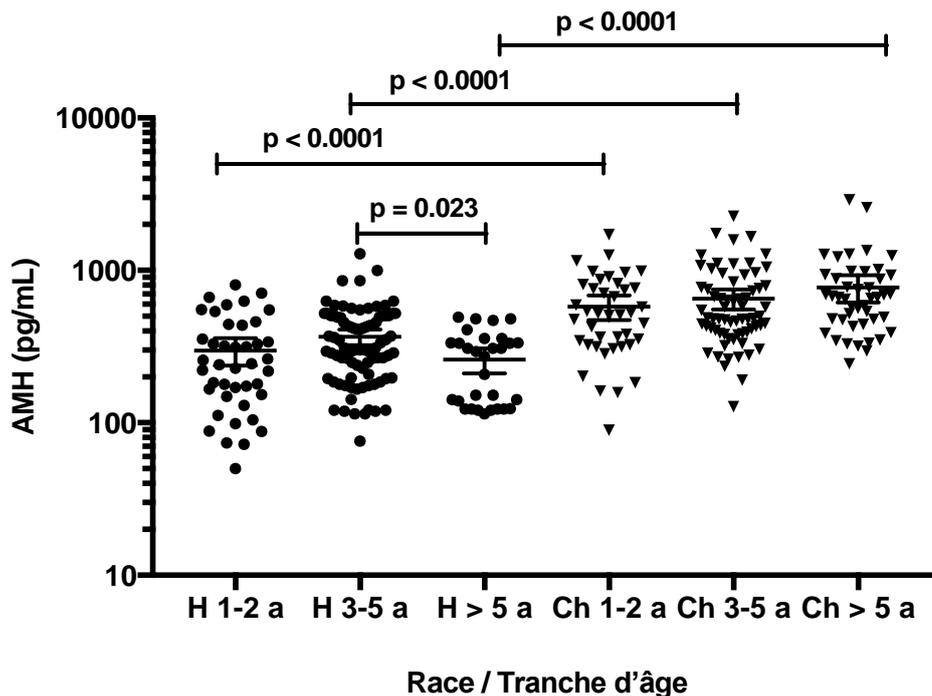


Figure 23 : Concentrations sériques en hormone anti-Müllérienne selon la tranche d'âge chez les vaches Holstein (●) et Charolaise (▼)

Les valeurs rapportées correspondent à la probabilité de rejet de l'hypothèse H0 (à savoir les tranches d'âge sont équivalentes) obtenue par un test t non apparié

b. Influence des facteurs de variation

i. Influence du cycle ovarien

La concentration en AMH a été suivie au cours du cycle ovarien sur 4 vaches. Le cycle a été positionné par la détermination des concentrations en progestérone et en œstradiol. La Figure 24 représente les données obtenues.

On observe une indépendance de la concentration en AMH ($p = 0.83$) en fonction du cycle ovarien.

Cette observation permet d'envisager l'utilisation du marqueur en prise de sang unique, ce dernier n'étant pas dépendant du moment de prélèvement par rapport au cycle ovarien.

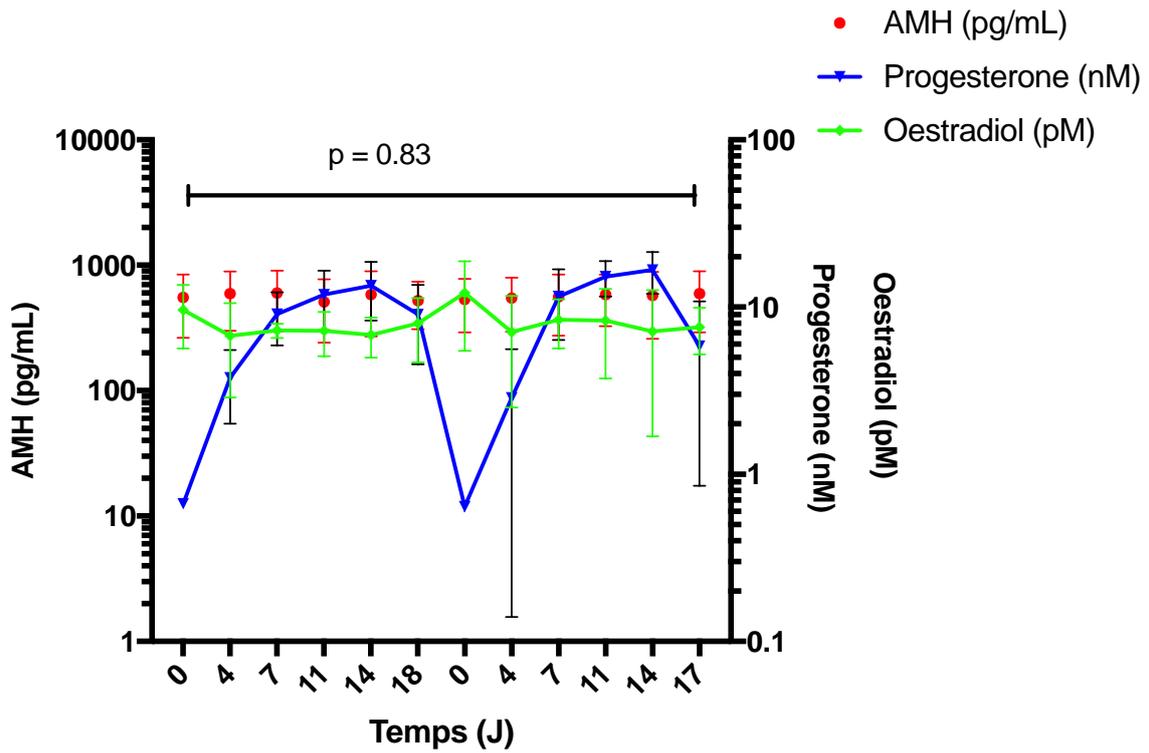


Figure 24 : Concentrations sériques en hormone anti-Müllérienne en fonction du cycle ovarien (n = 4)

Les concentrations \pm SD en AMH (rouge), en progestérone (bleu) et en œstradiol (vert) ont été reportées sur la figure. La probabilité associée au rejet de l'hypothèse H0 (  savoir la concentration en AMH est dépendante de l'échéance)

ii. Influence de l'âge entre la naissance et un âge pré-pubère (200 jours)

La concentration en AMH a été suivie au cours de la croissance de 7 génisses de race Holstein sur une période d'un peu moins d'un an.

L'évolution de la concentration sanguine individuelle en AMH est présentée dans la Figure 25.

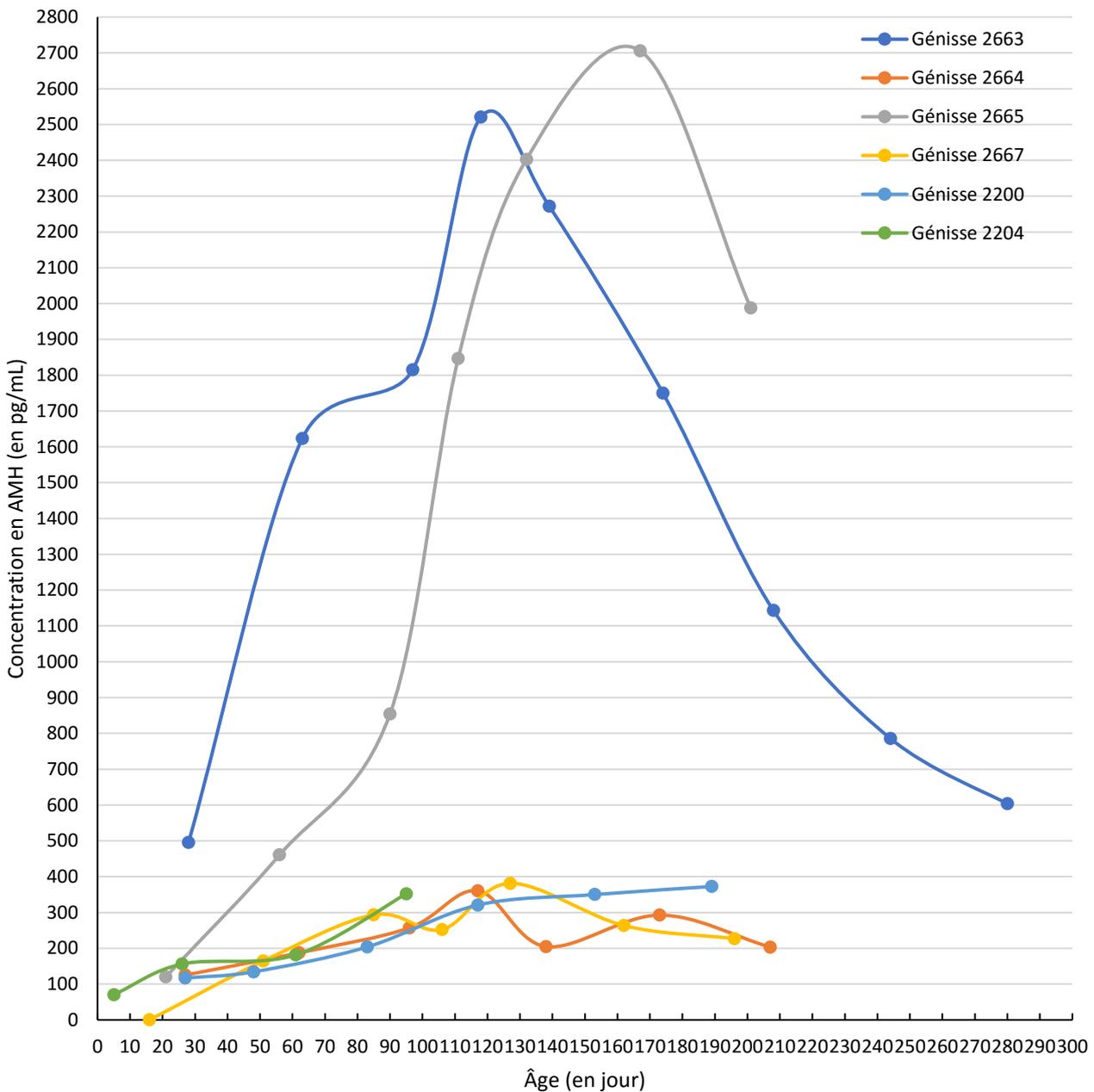


Figure 25 : Concentrations sériques en hormone anti-Müllérienne en fonction de l'âge depuis la naissance jusqu'à un âge pré-pubère

Au cours de cette période d'âge, la concentration en AMH apparaissait très disparate. En effet, une augmentation plus ou moins importante de la concentration

plasmatique en AMH a été observée pour atteindre une valeur maximale vers 4-5 mois. De manière surprenante, si cette augmentation semble être observée chez toutes les génisses, l'amplitude de la variation semble être dépendante de l'animal même si le trop faible nombre d'animaux suivis ne permet pas de tirer de fortes conclusions sur les variations précoces en AMH. La concentration revient à un niveau basal avant l'âge de 1 an.

On peut néanmoins noter que la cinétique de la concentration en AMH chez les individus pré-pubères est totalement différente que celle des animaux cyclés, et que son évaluation est beaucoup plus complexe.

L'étude ne comprenant pas assez d'individus, nous n'avons pas pu modéliser les variations de la concentration en AMH chez des vaches laitières prépubères.

III. Discussion

L'AMH est un marqueur potentiel prometteur pouvant aider à la conduite d'élevage en améliorant la fertilité d'un troupeau. Notre étude a porté sur la caractérisation de la diversité biologique des concentrations plasmatiques en AMH chez deux races bovines emblématiques de la production en France : une race Holstein et une race Charolaise. Ces deux races ont des attendus économiques très différents, l'une probablement plus rustique, la race Charolaise, dont l'attendu économique est la production de veaux destinés à la boucherie, l'autre, plus sélectionnée, orientée vers la production lactée.

Afin de pouvoir prétendre à l'utilisation de la concentration plasmatique en AMH comme marqueur de fertilité, il est indispensable de comprendre les variations de concentrations physiologiques au cours de la vie d'une vache.

Evolution de la concentration plasmatique en AMH avec l'âge de l'animal chez l'adulte

L'AMH est utilisée, chez la femme, comme un indicateur de la réserve ovarienne puisque, avec le vieillissement, la taille de la réserve décline et compromet éventuellement la fertilité (HANSEN *et al.*, 2011). Chez la souris, la diminution de la concentration en AMH est corrélée avec la diminution du nombre de follicules primordiaux (KEVENAAR *et al.*, 2006). Jusqu'à très récemment, peu de données étaient disponibles sur l'évaluation de la réserve ovarienne chez les bovins.

Notre étude a permis de mettre en évidence en relative grande disparité des concentrations en AMH au sein d'un même troupeau de vaches de race Holstein (de 50 à 1284 pg/mL). Plusieurs études ont rapporté une grande variabilité pour à la fois les concentrations plasmatiques en AMH que le comptage de follicules antraux (RICO *et al.*, 2009 ; BURNS *et al.*, 2005 ; IRELAND *et al.*, 2007). D'une façon intéressante, la concentration en AMH apparaît stable au cours de la vie économique de l'animal, même si une différence significative a été observée en regroupant les vaches Holstein de plus de 5 ans par rapport à la tranche d'âge 3 à 5 ans. S'il est évident que les animaux n'ont pas été suivis individuellement pendant la période explorée (1 à 9 ans), il apparaît raisonnable d'expliquer cette stabilité dans la distribution retrouvée au sein du troupeau par un maintien stable de la concentration individuelle. Il est important de considérer ce paramètre comme constant rendant possible son utilisation en routine quel que soit l'âge de l'animal. En effet, si le comptage des follicules antraux est très variable d'une vache à l'autre, le comptage des follicules antraux apparaît très répétable d'un cycle à l'autre sur la même vache (IRELAND *et al.*, 2008). Le nombre de follicules antraux engagés dans la folliculogenèse et observables à l'échographie est très fortement corrélé au nombre de follicules engagés plus avant dans la maturation (IRELAND *et al.*, 2008). Ainsi, considérant le lien établi entre le comptage folliculaire et la concentration circulante en AMH (IRELAND *et al.*, 2008), la mise à disposition d'un outil analytique permettant une détermination rapide et peu coûteuse de la concentration en AMH apparaît pertinente dans l'aide à la conduite d'élevage.

La relative stabilité du paramètre dans le temps de l'âge économique de l'animal apparaît raisonnable, particulièrement pour les races de haute production lactée, tant le temps économique est décalé par rapport au temps de vie biologique de l'animal.

Toutefois, des études ont montré des variations associées au nombre de lactations des animaux. Ainsi, RIBEIRO *et al.* (2014) ont observés que des vaches engagées dans les 2^{ème} et 3^{ème} lactation présentaient des concentrations en AMH plus élevées que celle aux lactations 1 et 4 laissant suggérer que le nombre de follicules antraux recrutés pouvait changer avec l'âge et qu'il serait maximal à 4 - 5 ans d'âge. Dans notre étude, nous n'avons pas observé cette disparité même si la pente positive de notre régression laisse entrevoir une légère augmentation de la concentration plasmatique en AMH avec l'âge. Par contre, sans que notre étude puisse le montrer clairement, la distribution de l'AMH chez les vaches les plus âgées semble écarter les valeurs extrêmes (animaux à AMH basse ou haute). Cette simplification de la distribution a été observée chez des vaches après la 3^{ème} lactation (JIMENEZ-KRASSEL *et al.*, 2015). Il est supposé que la conduite d'élevage conduit à écarter les animaux appartenant aux extrêmes des concentrations en AMH. Cette étude renforce la pertinence d'une valeur prédictive du devenir de l'animal dans l'élevage à partir d'une détermination unique de son AMH plasmatique. Enfin, la restriction de la diversité en AMH avec le vieillissement pourrait expliquer les résultats d'une apparente augmentation de l'AMH chez des vaches de plus de 5 ans (RIBEIRO *et al.*, 2014).

Dans notre étude, une distribution équivalente de la distribution en AMH a été retrouvée dans la race Charolaise avec, sinon une légère augmentation, *a minima*, une stabilité dans le temps de la vie économique de la vache. D'une façon intéressante, la moyenne des concentrations retrouvées dans la race Charolaise était de l'ordre de deux fois plus élevées que celles retrouvées dans la race Holstein. Cette observation laisse entrevoir une très grande disparité dans le niveau de base des concentrations en AMH en fonction des races bovines. Ceci entraîne donc une conséquence pratique importante et impose de définir des valeurs attendues dans chacune des races bovines d'intérêt économique. Des différences de niveaux d'expression de l'AMH dans les différentes races bovines n'ont pas été rapportées. Toutefois, des études rapportent des différences entre les races, notamment avec des races rustiques, en comparaison avec des races rustiques comme la Jersiaise, le Zébu (RIBEIRO *et al.*, 2014 ; BALDRIGHI *et al.*, 2014 ; BATISTA *et al.*, 2016). De même, des variations de concentrations sont habituellement rapportées entre les vaches à viande comme la Angus, la Charolaise en comparaison avec des vaches productrices de lait comme la Jersiaise (PFEIFFER *et al.*, 2014).

Evolution de la concentration plasmatique en AMH chez le jeune

Notre étude, menée sur des veaux Holstein depuis la naissance jusqu'à un âge pré-pubère a montré un comportement très variable dans le profil plasmatique de l'AMH. Alors que les veaux semblent présenter à la naissance une concentration indétectable en AMH, une augmentation qui peut, individuellement, être importante avec un maximum dans les 4 à 5 mois d'âge. La concentration plasmatique diminue ensuite pour vraisemblablement revenir à la concentration retrouvée chez l'adulte. Chez la femelle, la concentration augmente également de la naissance jusqu'à 3 mois d'âge environ puis se stabilise jusqu'à la puberté (HAGEN *et al.*, 2012). Des études menées sur des génisses Holstein ont montré une augmentation de la concentration au cours des deux premiers mois pour diminuer à partir du 5^{ème} mois et se stabiliser au cours du 9^{ème} mois (MONNIAUX *et al.*, 2012). Ce mécanisme semble général à

l'espèce car des concentrations plus élevées ont également été observées chez les jeunes Zébus en comparaison aux adultes (BATISTA *et al.*, 2016).

De façon surprenante, notre étude ne montre pas un profil équivalent entre chaque veau, certains présentant une augmentation beaucoup plus modeste. Une étude récente menée sur des vaches noires japonaises a montré une augmentation importante de la concentration plasmatique en AMH de la naissance jusqu'à la semaine 10-12 semaines d'âge pour décliner progressivement et atteindre un niveau de base vers l'âge de 6 mois (EL-SHEIKH, *et al.*, 2017). De façon intéressante, cette différence observée entre les génisses s'accompagnait d'une plus ou moins grande précocité dans l'âge de la puberté (EL-SHEIKH, *et al.*, 2017). Dans ce contexte et, compte tenu du très faible effectif des génisses explorées dans notre étude, il est possible que, dans la race Holstein, les génisses présentant un pic important d'AMH dans les premiers mois de vie présentent également une puberté précoce. Cette différence de précocité dans la puberté pourrait éventuellement être expliquée par une réserve ovarienne plus faible des génisses issues de mères primipares (AKDARINEJAD *et al.*, 2018). Une autre explication proposée est que les variations pré-pubères en AMH soient la conséquence de modifications de la capacité de synthèse par les cellules de la granulosa.

En tout état de cause, si la concentration en AMH de génisses pré-pubères devait être utilisée pour prédire la fertilité de l'animal, l'âge de l'animal au moment du prélèvement devra être connu.

Influence des cycles ovariens sur la concentration plasmatique en AMH

Une détermination toutes les semaines, menée sur quatre vaches, a permis de suivre l'influence du cycle ovarien sur la concentration plasmatique en AMH. Sur près de deux cycles, aucune variation significative n'a pu être notée sur la concentration en AMH.

Chez la femme, la concentration en AMH reste relativement constante pendant le cycle menstruel (COOK *et al.*, 2000). Chez les bovins, de nombreuses études confirment que l'AMH n'est pas affectée par le cycle ovarien. Chez les vaches Holstein, l'AMH plasmatique ne varie que de façon minimale pendant le cycle (RICO *et al.*, 2009 ; SOUZA *et al.*, 2015). Il en est de même lors de programmes de maîtrise hormonale des cycles avec des concentrations similaires entre les vaches synchronisées ou non (PFEIFFER *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces données confortent la stabilité de la concentration plasmatique en AMH pendant le cycle ovarien permettant de considérer la pertinence qu'un prélèvement unique réalisé chez l'adulte est représentatif de la concentration en AMH de l'animal.

Applications possibles dans la conduite de troupeau

Notre étude a permis de montrer que le niveau d'expression de l'AMH variait d'une race bovine à une autre rendant nécessaire, dans l'optique de l'utilisation du marqueur comme un indicateur prédictif de la fertilité de l'animal, d'envisager de disposer de valeurs de référence dans les principales races économiques.

La concentration en AMH est suffisamment stable au cours de la vie de l'adulte, et reste non influencée par le cycle ovarien ou la lactation, pour qu'un prélèvement unique puisse être pertinent.

Dans un troupeau donné, évaluer la concentration sérique en AMH des génisses avant la mise à la reproduction pourrait permettre d'avoir une idée plus précise du potentiel reproducteur de ces dernières, en corrélation avec tous les autres indicateurs déjà connus (poids à la mise à la reproduction par exemple). Une utilisation du marqueur sur des génisses pré-pubères devra prendre en considération l'âge de l'animal au moment du prélèvement. En effet, un prélèvement entre 2 et 5 mois permettrait de distinguer les génisses présentant un fort potentiel ovarien avec une probable puberté précoce.

Comme ont pu le prouver de nombreuses études, la concentration en AMH est un bon indicateur de la réussite des protocoles de super-ovulation dans le cadre du transfert d'embryon. Ainsi, au sein d'un troupeau donné, si l'éleveur envisage d'avoir recours au transfert d'embryon, il semble intéressant de faire un dosage d'AMH sur toutes ces donneuses potentielles pour l'aider à sélectionner celle dont le rendement sera le plus important.

Il est important de noter que le taux d'AMH est un outil supplémentaire et complémentaire qui tend à s'intégrer dans le schéma de gestion de la reproduction chez l'espèce bovine. Il ne peut en aucun cas remplacer les autres indicateurs individuels et relatifs à l'élevage dans la conduite du troupeau. Il s'agit d'une valeur supplémentaire que l'éleveur peut prendre en compte dans ses choix. De plus, la réalisation d'un tel dosage reste relativement abordable, tant d'un point de vue pratique que d'un point de vue économique ; surtout quand on pense aux frais que l'éleveur peut engager en matière de reproduction.

CONCLUSION

La maîtrise de la reproduction est essentielle en élevage bovin, notamment en élevage laitier. Au cours des dernières années, des procédés coûteux et techniques tels que le transfert d'embryons se développent. Différentes études cherchent donc à trouver des outils utilisables en pratique pouvant améliorer le rendement de ces techniques qui représentent un coût non négligeable pour les éleveurs. Si on arrive à anticiper le résultat d'un transfert d'embryon (nombre d'embryons produits par la donneuse, nombre d'embryons viables dans la receveuse), les investissements à faire sont plus sûrs. Une hormone intéresse tout particulièrement ces groupes d'études : l'hormone anti-müllérienne. Celle-ci est en effet corrélée de façon positive avec le nombre de follicules antraux. Elle semble également être un très bon indicateur de la réussite, ou de l'échec des protocoles de super-ovulation, et de manière plus indirecte de la durée de vie d'une vache au sein d'un troupeau donné.

Le but principal de cette étude est d'établir un profil cinétique de la quantité d'hormone anti-müllérienne au cours de la vie des bovins.

Nous avons ainsi montré que la concentration en hormone anti-müllérienne est stable au cours d'un cycle chez les vaches adultes. La valeur d'AMH plasmatique n'est donc pas influencée par les variations ovariennes observables au cours d'un cycle normal.

De plus, la concentration en hormone anti-müllérienne présente une grande variabilité inter-individuelle. Au sein d'un troupeau donné, les valeurs sont très variables, surtout chez les primipares. L'écart est beaucoup moins important entre les vaches plus âgées. Ceci peut s'expliquer par le fait que les vaches ayant les taux d'AMH les plus faibles sont réformées plus précocement du fait de leur productivité plus faible. Au contraire, les vaches ayant un taux d'AMH plus élevé sont conservées plus longtemps au sein du troupeau.

Les races plus « rustiques » (ici les Charolaises) ont des taux d'AMH globalement plus élevés. Les concentrations plus faibles chez les races hautes productrices peuvent s'expliquer par la sélection génétique drastique portant principalement sur la quantité de lait produite, souvent au détriment des critères de fertilité et de fécondité.

Ce travail a également mis en évidence des concentrations en hormone anti-müllérienne très variable dans les premiers mois de vie des génisses laitières. Cependant, aucun modèle théorique n'a pu être dégagé de cette étude. Cette conclusion est à nuancer du fait du faible nombre de génisses inclus dans l'étude : une étude avec un pool plus important est indispensable pour confirmer ou infirmer ce résultat.

En mettant en relation, les résultats de cette étude et les données déjà décrites dans la bibliographie, notamment concernant la corrélation entre la concentration en hormone anti-müllérienne et les réponses aux traitements de super-ovulation et également de la productivité au sein du troupeau. On peut conclure qu'un dosage de l'hormone anti-müllérienne plasmatique au moment de la puberté est une valeur fiable et utilisable pour déterminer le futur reproducteur des vaches. Le dosage de l'hormone anti-müllérienne doit être envisagé comme un outil supplémentaire et complémentaire dans la conduite de la reproduction en élevage bovin.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, G.P., Evans, A.C.O., Rawlings, N.C. (Department of V.A., 1994. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* (United Kingdom).
- Adams, G.P., Matteri, R.L., Ginther, O.J., 1992a. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 96, 627–640.
- Adams, G.P., Matteri, R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C., Ginther, O.J., 1992b. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 94, 177–188.
- Adashi, E.Y., Resnick, C.E., Brodie, A.M., Svoboda, M.E., Van Wyk, J.J., 1985. Somatomedin-C-mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 117, 2313–2320. <https://doi.org/10.1210/endo-117-6-2313>
- Akbarinejad, V., Gharagozlou, F., Vojgani, M., Bagheri Amirabadi, M.M., 2018. Nulliparous and primiparous cows produce less fertile female offspring with lesser concentration of anti-Müllerian hormone (AMH) as compared with multiparous cows. *Anim Reprod Sci.*, 197, 222-230. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.08.032
- Austin IVF Cycles, 2014. Austin Fertility & Reproductive Medicine.
- Baarends, W.M., Uilenbroek, J.T., Kramer, P., Hoogerbrugge, J.W., van Leeuwen, E.C., Themmen, A.P., Grootegoed, J.A., 1995. 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* 136, 4951–4962. <https://doi.org/10.1210/endo.136.11.7588229>
- Baarends, W.M., van Helmond, M.J., Post, M., van der Schoot, P.J., Hoogerbrugge, J.W., de Winter, J.P., Uilenbroek, J.T., Karels, B., Wilming, L.G., Meijers, J.H., 1994. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. *Development* 120, 189–197.
- Badinga, L., Driancourt, M.A., Savio, J.D., Wolfenson, D., Drost, M., De La Sota, R.L., Thatcher, W.W., 1992. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 47, 871–883.
- Baldrighi, J.M., Sá Filho, M.F., Batista, E.O., Lopes, R.N., Visintin, J.A., Baruselli, P.S., Assumpção, M.E., 2014. Anti-Müllerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. *Reprod Domest Anim.* 49(6), 1015-1020. doi: 10.1111/rda.
- Bao, B., Garverick, H.A., 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.* 76, 1903–1921.
- Bao, B., Garverick, H.A., Smith, G.W., Smith, M.F., Salfen, B.E., Youngquist, R.S., 1997a. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated

- with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 56, 1158–1168.
- Bao, B., Garverick, H.A., Smith, G.W., Smith, M.F., Salfen, B.E., Youngquist, R.S., 1997b. Expression of messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta4,delta5 isomerase (3beta-HSD) during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3beta-HSD mRNA within the granulosa cell layer. *Biol. Reprod.* 56, 1466–1473.
- Barone, R., 2001. Anatomie comparée des mammifères domestiques. Appareil urogénital, fœtus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale Vol. 4, Vol. 4., Vigot, Paris.
- Batista, E.O.S., Guerreiro, B.M., Freitas, B.G., Silva, J.C.B., Vieira, L.M., Ferreira, R.M., Rezende, R.G., Basso, A.C., Lopes, R.N.V.R., Rennó, F.P., Souza, A.H., Baruselli, P.S., 2016. Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker to select *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) calves for in vitro embryo production. *Domestic Animal Endocrinology* 54, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.08.001>
- Batista, E.O.S., Macedo, G.G., Sala, R.V., Ortolan, M., Filho, M.S., Valle, T.D., Jesus, E.F., Lopes, R., Rennó, F.P., Baruselli, P.S., 2014. Plasma Antimüllerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. *Reproduction in Domestic Animals* 49, 448–452. <https://doi.org/10.1111/rda.12304>
- Berglund, B., 2008. Genetic improvement of dairy cow reproductive performance. *Reprod. Domest. Anim.* 43 Suppl 2, 89–95. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01147.x>
- Berry, D.P., Wall, E., Pryce, J.E., 2014. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. *Animal* 8 Suppl 1, 105–121. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000743>
- Betteridge, K.J., Smith, C., Stubbings, R.B., Xu, K.P., King, W.A., 1989. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 38, 87–98.
- Bézar, J., Vigier, B., Tran, D., Mauléon, P., Josso, N. 1987. Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. *Journal of Reproduction and Fertility* 80, 509–516.
- Bó, G.A., Mapletoft, R.J., 2014. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 81, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>
- Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Knight, P.G., Ireland, J.J., 2005. Numbers of Antral Follicles During Follicular Waves in Cattle: Evidence for High Variation Among Animals, Very High Repeatability in Individuals, and an Inverse Association with Serum Follicle-Stimulating Hormone Concentrations. *Biol Reprod* 73, 54–62. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277>
- Cammack, K.M., Thomas, M.G., Enns, R.M., 2009. Reproductive Traits and Their Heritabilities in Beef Cattle. *The Professional Animal Scientist* 25, 517–528. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30753-1](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30753-1)
- Cate, R.L., Mattaliano, R.J., Hession, C., Tizard, R., Farber, N.M., Cheung, A., Ninfa, E.G., Frey, A.Z., Gash, D.J., Chow, E.P., 1986. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45, 685–698.

- Cohen-Haguenuer, O., Picard, J.Y., Mattéi, M.G., Serero, S., Nguyen, V.C., de Tand, M.F., Guerrier, D., Hors-Cayla, M.C., Josso, N., Frézal, J., 1987. Mapping of the gene for anti-müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenet. Cell Genet.* 44, 2–6. <https://doi.org/10.1159/000132332>
- Cole, J.B., Van Raden, P.M., 2009. Net merit as a measure of lifetime profit: 2010 revision. *AIPL Research Reports*.
- Cook, C.L., Siow, Y., Taylor, S., Fallat, M.E., 2000. Serum müllerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertility and Sterility* 73:859–861. (doi:10.1016/S0015-0282(99)00639-1)
- Cushman, R.A., Allan, M.F., Kuehn, L.A., Snelling, W.M., Cupp, A.S., Freetly, H.C., 2009. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *J Anim Sci* 87, 1971–1980. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1728>
- Danell, B. (Sveriges L., 1987. Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. *Sveriges Lantbruksuniv.*
- De la Sota, R.L., Lucy, M.C., Staples, C.R., Thatcher, W.W., 1993. Effects of recombinant bovine somatotropin (sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 1002–1013. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77428-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77428-7)
- Dobson, H., Dean, P.D.G., 1974. Radioimmunoassay of oestrone, oestradiol-17 α -17 β in bovine plasma during cycle and last stages of pregnancy. *Journal of Endocrinology* 61, 479–486. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0610479>
- Driancourt, M.A., 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55, 1211–1239.
- Driancourt, M.A., Gougeon, A., Thibault, C., 1991. La fonction ovarienne. pp. 273–298.
- Durlinger, A.L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F.H., Uilenbroek, J.T., Grootegoed, J.A., Themmen, A.P. 1999. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140, 5789–5796.
- Durlinger, A.L., Gruijters, M.J., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T.R., Matzuk, M.M., Rose, U.M., de Jong, F.H., Uilenbroek, J.T., Grootegoed, J.A., Themmen, A.P., 2001. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142, 4891–4899. <https://doi.org/10.1210/endo.142.11.8486>
- Durlinger, A.L., Visser, J.A., Themmen, A.P., 2002. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction* 124, 601–609. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1240601>
- Echternkamp, S.E., Spicer, L.J., Gregory, K.E., Canning, S.F., Hammond, J.M., 1990. Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol. Reprod.* 43, 8–14.
- El-Sheikh Ali, H., Kitahara, G., Takahashi, T., Mido, S., Sadawy, M., Kobayashi, I., Hemmi, K., Osawa, T., 2017. Plasma anti-Müllerian hormone profile in heifers from birth through puberty and relationship with puberty onset. *Biol Reprod.* 1, 97(1), 153-161. doi: 10.1093/biolre/iox069.
- Elvin, J.A., Yan, C., Matzuk, M.M., 2000. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Mol. Cell. Endocrinol.* 159, 1–5.
- Erickson, B.H., 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 25, 800–805.
- Evans, A.C.O., Mossa, F., Walsh, S.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Ireland, J.J., n.d. Effects of Maternal Environment During

- Gestation on Ovarian Folliculogenesis and Consequences for Fertility in Bovine Offspring. *Reproduction in Domestic Animals* 47, 31–37. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x>
- Fanchin, R., Schonäuer, L.M., Righini, C., Guibourdenche, J., Frydman, R., Taieb, J., 2003. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum. Reprod.* 18, 323–327.
- Findlay, J.K., 1993. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.* 48, 15–23.
- Findlay, J.K., Clarke, I.J., Luck, M.R., Rodgers, R.J., Shukovski, L., Robertson, D.M., Klein, R., Murray, J.F., Scaramuzzi, R.J., Bindon, B.M., 1991. Peripheral and intragonadal actions of inhibin-related peptides. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 43, 139–150.
- Fortune, J.E., 1993. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility? *Animal Reproduction Science, Current Advances in the Manipulation of Reproductive Function in Domestic Animals* 33, 111–125. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90110-D](https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90110-D)
- Fortune, J.E., Sirois, J., Quirk, S.M., 1988. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology, Annual Conference of the International Embryo Transfer Society* 29, 95–109. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90034-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90034-9)
- Fortune, J.E., Vincent, S.E., 1983. Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro. *Biol. Reprod.* 28, 1078–1089.
- Ginther, O.J., Bashir, S.T., Santos, V.G., Beg, M.A., 2013. Contralateral ovarian location between the future ovulatory follicle and extant corpus luteum increases the length of the luteal phase and number of follicular waves in heifers. *Theriogenology* 79, 1130–1138. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.010>
- Ginther, O.J., Hoffman, M.M., 2014. Intraovarian effect of dominant follicle and corpus luteum on number of follicles during a follicular wave in heifers. *Theriogenology* 82, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.03.013>
- Ginther, O.J., Knopf, L., Kastelic, J.P., 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 41, 247–254.
- Gobikrushanth, M., Dutra, P.A., Bruinjé, T.C., Colazo, M.G., Butler, S.T., Ambrose, D.J., 2017. Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. *Theriogenology*. 1, 92:90-94. doi: 10.1016/j.
- Guerreiro, B.M., Batista, E.O.S., Vieira, L.M., Sá Filho, M.F., Rodrigues, C.A., Castro Netto, A., Silveira, C.R.A., Bayeux, B.M., Dias, E.A.R., Monteiro, F.M., Accorsi, M., Lopes, R.N.V.R., Baruselli, P.S., 2014. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domestic Animal Endocrinology* 49, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.07.002>
- Hagen, C.P., Aksglaede, L., Sørensen, K., Mouritsen, A., Andersson, A.-M., Petersen, J.H., Main, K.M., Juul, A., 2012. Individual serum levels of anti-Müllerian hormone in healthy girls persist through childhood and adolescence: a longitudinal cohort study. *Hum. Reprod.* 27, 861–866. <https://doi.org/10.1093/humrep/der435>

- Hansen, K.R., Hodnett, G.M., Knowlton, N., Craig, L.B. 2011. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertility and Sterility* 95, 170–175. (doi:10.1016/j.fertnstert.2010.04.006)
- Hanzen, C., Lourtie, O., Drion, P.V., 2000. Le développement folliculaire chez la vache. *Annales de Medecine Veterinaire* 144, 225–235.
- Hasler, J.F., 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 81, 152–169. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>
- Hirayama, H., Kageyama, S., Naito, A., Fukuda, S., Fujii, T., Minamihashi, A., 2012. Prediction of superovulatory response in Japanese Black cattle using ultrasound, plasma anti-Müllerian hormone concentrations and polymorphism in the ionotropic glutamate receptor AMPA1/GRIA1. *J. Reprod. Dev.* 58, 380–383.
- Hutchinson, L.A., Findlay, J.K., de Vos, F.L., Robertson, D.M., 1987. Effects of bovine inhibin, transforming growth factor- β and bovine activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 146, 1405–1412. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(87\)90806-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(87)90806-0)
- Ireland, J.J., Smith, G.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Mossa, F., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2010. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 1–14. <https://doi.org/10.1071/RD10226>
- Ireland, J.J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum. Reprod.* 22, 1687–1695. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem071>
- Ireland, J.J., Zielak-Steciwko, A.E., Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Bettgowda, A., Scheetz, D., Walsh, S., Mossa, F., Knight, P.G., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2009. Variation in the Ovarian Reserve Is Linked to Alterations in Intrafollicular Estradiol Production and Ovarian Biomarkers of Follicular Differentiation and Oocyte Quality in Cattle. *Biol Reprod* 80, 954–964. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.073791>
- Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Hou, X., Davis, J.S., Lonergan, P., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2009. Evidence That High Variation in Ovarian Reserves of Healthy Young Adults Has a Negative Impact on the Corpus Luteum and Endometrium During Estrous Cycles in Cattle. *Biol Reprod* 80, 1272–1281. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075093>
- Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D.M., Neuder, L.M., Ireland, J.L.H., Pursley, J.R., Smith, G.W., Tempelman, R.J., Ferris, T., Roudebush, W.E., Mossa, F., Lonergan, P., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2015. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *Journal of Dairy Science* 98, 3036–3045. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8130>
- Josso, N., Cate, R.L., Picard, J.Y., Vigier, B., di Clemente, N., Wilson, C., Imbeaud, S., Pepinsky, R.B., Guerrier, D., Boussin, L., 1993a. Anti-müllerian hormone: the Jost factor. *Recent Prog. Horm. Res.* 48, 1–59.

- Josso, N., Lamarre, I., Picard, J.Y., Berta, P., Davies, N., Morichon, N., Peschanski, M., Jeny, R., 1993b. Anti-müllerian hormone in early human development. *Early Hum. Dev.* 33, 91–99.
- Kastelic, J.P., Ko, J.C., Ginther, O.J., 1990. Suppression of dominant and subordinate ovarian follicles by a proteinaceous fraction of follicular fluid in heifers. *Theriogenology* 34, 499–509.
- Kendrick, K.W., Bailey, T.L., Garst, A.S., Pryor, A.W., Ahmadzadeh, A., Akers, R.M., Eyestone, W.E., Pearson, R.E., Gwazdauskas, F.C., 1999. Effects of energy balance of hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. *J. Dairy Sci.* 82, 1731–1741.
- Kevenaar, M.E., Meerasahib, M.F., Kramer, P., van de Lang-Born, B.M., de Jong, F.H., Groome, N.P., Themmen, A.P., Visser, J.A. 2006. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* 147, 3228–3234. (doi:10.1210/en.2005-1588)
- König, S., Bosselmann, F., von Borstel, U.U., Simianer, H., 2007. Genetic analysis of traits affecting the success of embryo transfer in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 90, 3945–3954. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0089>
- Lashen, H., Dunger, D.B., Ness, A., Ong, K.K., 2013. Peripubertal changes in circulating antimüllerian hormone levels in girls. *Fertil Steril* 99, 2071–2075. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.139>
- Lee, M.M., Donahoe, P.K., Hasegawa, T., Silverman, B., Crist, G.B., Best, S., Hasegawa, Y., Noto, R.A., Schoenfeld, D., MacLaughlin, D.T., 1996. Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 571–576. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.2.8636269>
- Lucy, M.C., Curran, T.L., Collier, R.J., Cole, W.J., 1994. Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. *Theriogenology* 41, 561–572.
- Lucy, M.C., Staples, C.R., Thatcher, W.W., Erickson, P.S., Cleale, R.M., Firkins, J.L., Clark, J.H., Murphy, M.R., Brodie, B.O., 1992. Influence of diet composition, dry-matter intake, milk production and energy balance on time of post-partum ovulation and fertility in dairy cows. *Animal Science* 54, 323–331. <https://doi.org/10.1017/S0003356100020778>
- Mariana, J.-C., Nguyen Huy, N., Manicom, M.-J., 1973. Folliculogénèse chez la vache. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* 13, 211–221. <https://doi.org/10.1051/rnd:19730520>
- Monniaux, Danielle, Barbey, S., Rico, C., Fabre, S., Gallard, Y., Larroque, H., 2010. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 1083–1091. <https://doi.org/10.1071/RD09279>
- Monniaux, D., Caraty, A., Clément, F., Dalbies Tran, R., Dupont, J., Fabre, S., Gérard, N., Mermillod, P., Monget, P., Uzbekova, S., 2009. Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *INRA Productions Animales* 2 (22), 59-76. (2009).
- Monniaux, D., Drouilhet, L., Rico, C., Estienne, A., Jarrier, P., Touzé, J.-L., Sapa, J., Phocas, F., Dupont, J., Dalbiès-Tran, R., Fabre, S., 2012. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 1–16. <https://doi.org/10.1071/RD12270>
- Monniaux, D., Monget, P., 1997. Gonadotropines et régulations paracrines ovariennes. Intégration des mécanismes de régulation d'un processus physiologique complexe, la folliculogénèse ovarienne. *Les gonadotropines* 267–284.

- Monniaux, D., Rico, C., Larroque, H., Dalbiès-Tran, R., Médigue, C., Clément, F., Fabre, S., 2010. L'hormone antimüllérienne, prédicteur endocrinien de la réponse à une stimulation ovarienne chez les bovins. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 38, 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2010.05.009>
- Mossa, F., Walsh, S.W., Butler, S.T., Berry, D.P., Carter, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Ireland, J.J., Evans, A.C.O., 2012. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95, 2355–2361. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4325>
- Padmanabhan, V., Convey, E.M., Roche, J.F., Ireland, J.J., 1984. Changes in inhibin-like bioactivity in ovulatory and atretic follicles and utero-ovarian venous blood after prostaglandin-induced luteolysis in heifers. *Endocrinology* 115, 1332–1340. <https://doi.org/10.1210/endo-115-4-1332>
- Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1987. Follicular populations during the estrous cycle in heifers. II. Influence of right and left sides and intraovarian effect of the corpus luteum. *Animal Reproduction Science* 14, 177–186. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(87\)90081-9](https://doi.org/10.1016/0378-4320(87)90081-9)
- Pfeiffer, K.E., Jury, L.J., Larson, J.E., 2014. Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology* 46, 58–64. (doi:10.1016/j.domaniend.2013.05.004)
- Pryce, J.E., Veerkamp, R.F., 2001. The incorporation of fertility indices in genetic improvement programmes. *BSAP Occasional Publication* 26, 237–249. <https://doi.org/10.1017/S0263967X00033711>
- Rahe, C.H., Owens, R.E., Fleeger, J.L., Newton, H.J., Harms, P.G., 1980. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology* 107, 498–503. <https://doi.org/10.1210/endo-107-2-498>
- Rey, R., Lordereau-Richard, I., Carel, J.C., Barbet, P., Cate, R.L., Roger, M., Chaussain, J.L., Josso, N., 1993. Anti-müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 1220–1226. <https://doi.org/10.1210/jcem.77.5.8077315>
- Ribeiro, E.S., Bisinotto, R.S., Lima, F.S., Greco, L.F., Morrison, A., Kumar, A., Thatcher, W.W., Santos, J.E., 2014. Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *J Dairy Sci.* 97(11), 6, 888-900. doi: 10.3168/jds.2014-7908.
- Richards, J.S., Jahnsen, T., Hedin, L., Lifka, J., Ratoosh, S., Durica, J.M., Goldring, N.B., 1987. Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Prog. Horm. Res.* 43, 231–276.
- Rico, C., Drouilhet, L., Salvetti, P., Dalbiès-Tran, R., Jarrier, P., Touzé, J.-L., Pillet, E., Ponsart, C., Fabre, S., Monniaux, D., 2012. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 932–944. <https://doi.org/10.1071/RD11290>
- Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., di Clemente, N., Clément, F., Bontoux, M., Touzé, J.-L., Dupont, M., Briant, E., Rémy, B., Beckers, J.-F., Monniaux, D., 2009. Anti-müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol. Reprod.* 80, 50–59. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072157>
- Rico, C., Médigue, C., Fabre, S., Jarrier, P., Bontoux, M., Clément, F., Monniaux, D., 2011. Regulation of Anti-Müllerian Hormone Production in the Cow: A Multiscale

- Study at Endocrine, Ovarian, Follicular, and Granulosa Cell Levels. *Biol Reprod* 84, 560–571. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088187>
- Roberson, M.S., Wolfe, M.W., Stumpf, T.T., Kittok, R.J., Kinder, J.E., 1989. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol. Reprod.* 41, 997–1003.
- Roberts, A.B., Anzano, M.A., Wakefield, L.M., Roche, N.S., Stern, D.F., Sporn, M.B., 1985. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 119–123.
- Rota, A., Ballarin, C., Vigier, B., Cozzi, B., Rey, R., 2002. Age dependent changes in plasma anti-Müllerian hormone concentrations in the bovine male, female, and freemartin from birth to puberty: relationship between testosterone production and influence on sex differentiation. *General and Comparative Endocrinology* 129, 39–44. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(02\)00514-2](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(02)00514-2)
- Santos, S.S.D., Ferreira, M. a. P., Pinto, J.A., Sampaio, R.V., Carvalho, A.C., Silva, T.V.G., Costa, N.N., Cordeiro, M.S., Miranda, M.S., Ribeiro, H.F.L., Ohashi, O.M., 2013. Characterization of folliculogenesis and the occurrence of apoptosis in the development of the bovine fetal ovary. *Theriogenology* 79, 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.09.026>
- Sartori, R., Barros, C.M., 2011. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science, Special Issue: Reproductive Cycles of Animals* 124, 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.006>
- Savio, J.D., Keenan, L., Boland, M.P., Roche, J.F., 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 83, 663–671.
- Savio, J.D., Thatcher, W.W., Badinga, L., de la Sota, R.L., Wolfenson, D., 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J. Reprod. Fertil.* 97, 197–203.
- Silva-Santos, K.C., Santos, G.M.G., Júnior, C.K., Morotti, F., Siloto, L.S., Marcantonio, T.N., Urbano, M.R., Oliveira, R.L., Lima, D.C.M., Seneda, M.M., 2014. Antral Follicle Populations and Embryo Production – In Vitro and In Vivo – of *Bos indicus-aurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. *Reproduction in Domestic Animals* 49, 228–232. <https://doi.org/10.1111/rda.12255>
- Singh, J., Domínguez, M., Jaiswal, R., Adams, G.P., 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 62, 227–243. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.020>
- Sirois, J., Fortune, J.E., 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39, 308–317.
- Souza, A.H., Carvalho, P.D., Rozner, A.E., Vieira, L.M., Hackbart, K.S., Bender, R.W., Dresch, A.R., Verstegen, J.P., Shaver, R.D., Wiltbank, M.C., 2015. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98, 169–178. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8182>
- Stock, A.E., Fortune, J.E., 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 132, 1108–1114. <https://doi.org/10.1210/endo.132.3.8440173>
- Sunderland, S.J., Crowe, M.A., Boland, M.P., Roche, J.F., Ireland, J.J., 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 101, 547–555.
- Takahashi, M., Hayashi, M., Manganaro, T.F., Donahoe, P.K., 1986a. The ontogeny of mullerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle. *Biol. Reprod.* 35, 447–453.

- Takahashi, M., Koide, S.S., Donahoe, P.K., 1986b. Müllerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 47, 225–234.
- Taylor, C., Manikkam, M., Rajamahendran, R., 1994. Changes in ovarian follicular dynamics and luteinizing hormone profiles following different progestagen treatments in cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 74, 273–279. <https://doi.org/10.4141/cjas94-038>
- Taylor, C., Rajamahendran, R., 1991. Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 71, 61–68. <https://doi.org/10.4141/cjas91-007>
- Thibault, C., Levasseur, M.-C., 2001. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Editions Quae.
- Thomas, F.H., Telfer, E.E., Fraser, H.M., 2007. Expression of anti-Müllerian hormone protein during early follicular development in the primate ovary in vivo is influenced by suppression of gonadotropin secretion and inhibition of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology* 148, 2273–2281. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1501>
- Tonhati, H., Lôbo, R.B., Oliveira, H.N., 1999. Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cows. *Theriogenology* 51, 1151–1156.
- Tran, N.D., Cedars, M.I., Rosen, M.P., 2011. The role of anti-müllerian hormone (AMH) in assessing ovarian reserve. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 3609–3614. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0368>
- Tsepelidis, S., Demeestere, I., Delbaere, A., Gervy, C., Englert, Y., 2007. Anti-müllerian hormone and its role in the regulation of ovarian function. *Rev Med Brux* 165–171.
- Turzillo, A.M., Fortune, J.E., 1990. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 89, 643–653.
- VERNUNFT, A., SCHWERHOFF, M., VIERGUTZ, T., DIEDERICH, M., KUWER, A., 2015. Anti-Müllerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes. *J Reprod Dev* 61, 74–79. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-091>
- Vigier, B., Picard, J.Y., Tran, D., Legeai, L., Josso, N., 1984a. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 114, 1315–1320. <https://doi.org/10.1210/endo-114-4-1315>
- Vigier, B., Tran, D., du Mesnil du Buisson, F., Heyman, Y., Josso, N., 1983. Use of monoclonal antibody techniques to study the ontogeny of bovine anti-Müllerian hormone. *J. Reprod. Fertil.* 69, 207–214.
- Vigier, B., Tran, D., Legeai, L., Bézard, J., Josso, N., 1984b. Origin of anti-Müllerian hormone in bovine freemartin fetuses. *J. Reprod. Fertil.* 70, 473–479.
- Visser, J.A., Themmen, A.P.N., 2005. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 234, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.09.008>
- Walsh, S.W., Mossa, F., Butler, S.T., Berry, D.P., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Tempelman, R.J., Carter, F., Lonergan, P., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2014. Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. *Journal of Dairy Science* 97, 4503–4511. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7758>
- Walsh, S.W., Williams, E.J., Evans, A.C.O., 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 123, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.12.001>

- Walters, D.L., Schallenberger, E., 1984. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. *J. Reprod. Fertil.* 71, 503–512.
- Woodruff, T.K., Lyon, R.J., Hansen, S.E., Rice, G.C., Mather, J.P., 1990. Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology* 127, 3196–3205. <https://doi.org/10.1210/endo-127-6-3196>
- Xiao, S., Robertson, D.M., Findlay, J.K., 1992. Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 131, 1009–1016. <https://doi.org/10.1210/endo.131.3.1505447>
- Ying, S.Y., Becker, A., Ling, N., Ueno, N., Guillemin, R., 1986. Inhibin and beta type transforming growth factor (TGF beta) have opposite modulating effects on the follicle stimulating hormone (FSH)-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136, 969–975.
- Zhou, B., Watts, L.M., Hutson, J.M., 1993. Germ cell development in neonatal mouse testes in vitro requires müllerian inhibiting substance. *J. Urol.* 150, 613–616.

BLANC Elodie

DEVELOPPEMENT D'UN IMMUNODOSAGE DE L'HORMONE ANTI-MÜLLERIENNE CHEZ LES BOVINS - EXPLOITATION D'UN BIOMARQUEUR POUR EVALUER LES PERFORMANCES DE REPRODUCTION

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, le 20 Décembre 2018

RÉSUMÉ

La découverte récente de l'implication de l'hormone anti-müllérienne dans la régulation du cycle ovarien et de sa corrélation étroite avec le nombre de follicules antraux permet d'envisager une éventuelle utilisation de cette dernière dans la gestion de la reproduction des troupeaux de bovins.

Le but de ce travail est de faire le point sur les connaissances actuelles en médecine vétérinaire sur l'hormone anti-müllérienne, sa place au sein du cycle ovarien et son caractère « prédictif » potentiellement utilisable dans les nouvelles techniques de reproduction, telles que le transfert d'embryon et la fécondation *in vitro*. L'objectif principal de cette étude préliminaire consiste à décrire la cinétique de l'hormone anti-müllérienne chez les vaches adultes cyclées. Il a également permis de démontrer la stabilité de la concentration en AMH plasmatique au cours d'un cycle. Cette étude n'a cependant pas permis de modéliser une cinétique chez les génisses prépubères. Il a également pour but de mettre en évidence une éventuelle différence entre une race « rustique » et une race hautement productive concernant les taux d'AMH.

MOTS CLÉS :

- Bovins
- Reproduction
- Hormone anti-müllérienne
- Immunodosage

JURY :

Président : Monsieur le Professeur René Ecochard
1er Assesseur : Monsieur le Professeur Thierry Buronfosse
2ème Assesseur : Madame la Professeur Dominique Legrand

DATE DE SOUTENANCE : 20/12/2018