

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Lieu de stage	
Introduction.....	1
Revue bibliographique	
I. Généralités.....	3
1. Historique.....	3
2. Rappel.....	3
II. Différenciation sexuelle.....	4
1. Définition.....	4
2. Processus physiologique.....	5
a) Sexe génétique.....	5
b) Stade indifférencié.....	5
c) Sexe gonadique.....	7
d) Sexe phénotypique.....	8
3. Facteurs chromosomiques.....	10
4. Facteurs génétiques	12
a) Stade indifférencié.....	12
b) Différenciation des testicules.....	13
c) Différenciation des ovaires.....	17
d) Interaction entre les différents gènes.....	19
5. Facteurs hormonaux.....	19
III. Troubles de différenciation sexuelle, mécanismes et aspects.....	21
1. Nomenclature et classification.....	21
2. Troubles de différenciation chromosomique.....	23
a) Syndrome de Klinefelter (47,XXY).....	23
b) Syndrome de Turner (45,X).....	24
c) Dysgénésie gonadique mixte (45,X/46,XY).....	25
d) Chimérisme (46,XX/46,XY).....	25
3. Troubles de différenciation sexuelle 46,XY (46,XY DSD).....	26
a) Troubles du développement gonadique (testiculaire).....	26
b) Troubles de synthèse ou d'action des androgènes.....	27
4. Troubles de différenciation sexuelle 46,XX (46,XX DSD).....	31
a) Troubles du développement gonadique (ovarien)	31
b) Troubles de synthèse des androgènes.....	32

IV. Diagnostic des troubles de différenciation sexuelle.....	34
V. Prise en charge	35
1. Assignation et réassignation du sexe.....	35
2. Chirurgie génitale.....	36
3. Gonadectomie.....	36
4. Traitement par des hormones sexuelles.....	36
VI. Conseil génétique	37
 Matériels et méthodes	
I. Série d'étude.....	38
II. Prélèvement sanguin & conservation.....	39
III. Caryotype par marquage aux bandes R.....	40
1. Principe.....	40
2. Réactifs nécessaires.....	40
3. Protocole expérimental.....	40
IV. Hybridation in situ fluorescente (FISH) via la sonde LSI SRY/CEPX	42
1. Principe.....	42
2. Réactifs nécessaires.....	42
3. Protocole expérimental.....	43
V. Extraction d'ADN par sel sur suspension cellulaire.....	44
1. Principe.....	44
2. Réactifs nécessaires.....	45
3. Protocole expérimental.....	45
VI. Extraction d'ADN par Kit sur suspension cellulaire.....	46
1. Principe.....	46
2. Réactifs nécessaires.....	46
3. Protocole expérimental.....	46
VII. Amplification du gène SRY par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	48
1. Principe.....	49
2. Réactifs nécessaires.....	49
3. Protocole expérimental.....	51
VII. Visualisation du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.....	51
1. Principe.....	51
2. Réactifs nécessaires.....	51
3. Protocole expérimental.....	51
IX. Séquençage du gène SRY.....	52
A. Purification du produit PCR.....	52
1. Principe.....	52

2. Réactifs nécessaires.....	52
3. Protocole expérimental.....	52
B. Réaction de séquence	53
1. Principe.....	53
2. Réactifs nécessaires.....	53
3. Protocole expérimental.....	53
C. Purification du produit de la réaction de séquence.....	54
1. Principe.....	54
2. Réactifs nécessaires.....	54
3. Protocole expérimental.....	54
D. Chargement du séquenceur.....	54

Résultats & Discussion

I. Résultat du caryotype.....	55
II. Les anomalies détectées	56
1. Syndrome de Turner.....	56
2. Femme XY.....	57
3. Dysgénésie gonadique mixte 45,X/46,XY.....	59
4. Homme XX.....	60
5. Syndrome de Klinefelter.....	61
III. Résultat de la FISH.....	62
IV. Résultat de la mise au point de la PCR multiplexe SRY/ DXS1684.....	65
V. Résultat de la PCR SRY/DXS1684 des patients.....	68
VI. Résultat du séquençage.....	71
Conclusion & Perspectives.....	76

Annexes

Glossaire

Références bibliographiques

Liste des abréviations

μ l	Microlitre
11 β OH	11 B Hydroxylase
17 OH progéstérone	17 Hydroxy Progestérone
17 β HSD	17 B Hydroxystéroïde Déshydrogénase
17-OHP	17 Hydroxy Progestérone
17 β -HSD	17 β -Hydroxystéroïde Deshydrogénase
A	Adénine
ACTH	Adrenocorticotrophic Hormone
ADN	Acide Désoxyribonucléotide
AMH	Anti-Mullarian Hormon
AR	Androgen Receptor
ARN	Acide Ribonucléotide
ATRX	Alpha Thalassemia,Mental Retardation Syndrome,X-Linked
AZF	Azoospermia Factor
BET	Bromure D'ethyldium
BMP15	Bonemorphogenicprotein15
C	Cytosine
CBX2	Chromoboxhomolog2
CIAS	Complete Androgen Insensitivity Syndrome
CYP21B	Gène De 21 Hydroxylase
DAX1	DSS-AHC Critical Region On Human X Chromosome Gene 1
ddNTP	Didésoxyribonucléotides Triphosphate
DHA	Dehydroépiandrostérone
DHH	Deserthedgehog
DHT	Dihydrotestostérone
DMRT1	Doublesexandmab3-Relatedtranscriptionfactor1
dNTP	Désoxyribonucléotides Triphosphate
DOC	Désoxcorticostérone
DPM	Developpement psychomoteur
DSD	Disorders Of Sex Development
DSS	Dosage Sensitive Sex Reversal
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique Acide
emx 2	Empty Spiracle Homolog 2
ESPE	European Society For Paediatric Endocrinology
F	Forward
F	Femelle
FGF9	Fibroblast Growth Factors 9
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FOX L2	Forkhead Transcription Factor
FSH	Follicule Stimulating Hormone
FSHR	Follicle-Stimulating Hormone Receptor

G	Guanosine
GATA 4	GATA-Binding Protein 4
GBY	Région Critique De Y De Développement De Gonadoblastome
GDF9	Growth Differentiation Factor9
h	Heure
hCG	Human Chorionic Gonadotrophin
HCS	Hyperplasie Congénitale Des Surrénales
HLA	Human Leucocyte Antigen
HMG	High Mobility Group
InsL3	Insuline-Like Hormone 3
IPA	Isopropyl De l'Alcool
JPC	Jour Post-Conception
Kb	Kilo Base
KCl	Chlorure De Potassium
Kd	Kilodalton
KTS	Lysine Thréonine Sérine
L	Litre
LH	Luteinizing Hormone
LHX9	Lim Homeobox Protein 9
LWPES	Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society
M	Mâle
MAMLD1	Master Mind-Like Domain-Containing Protein1
MGD	Mixed Gonadal Dysgenesis
ml	Millilitre
mn	Minute
NaCl	Chlorure De Sodium
ng	Nanogramme
NOBOX	Newborn Ovary Homeobox
NR5A1	Gène De SF1
OG	Organes Génitaux
OGE	Organes Génitaux Externes
PAR 1	Pseudo-Autosomal Region 1
PAR2	Pseudo-Autosomal Region 2
PAX 2	Paired Homeobox 2
pb	Paire De Base
PCG	Primordial Germ Cells
PCR	Polymerisation Chaine Raction
PGD2S	Prostaglandin D2 Synthase
pH	Potentiel Hydrogène
PHA	Phytohémagglutinine
PIAS	Partial Androgen Insensitivity Syndrome
PMDS	Persistent Mullerian Duct Syndrome
POF	Premature Ovarian Failure
POR	P450 Oxydoréductase
Pr. PCR	Produit PCR

R	Revers
RPM	Retard Psychomoteur
RS	Retard Statural
RSP	Retard Statutopondéral
RSPO1	Root-Plate Specific Spondin1
scc	Side Chain Clivage
SDHA	Sulfate De Déhydroépiandrostérone
SF1	Steroidogenic Factor 1
SHOX	Short Stature Homeobox
SLB	Solution De Lyse Des Globules Blancs
SOX 9	SRY-Related Box9
SRY	Sex Determining Region Of The Y Chromosome
ST	Syndrome De Turner
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
T	Tymine
T	Témoin
TAE	Tris-Acéte-Edta
TDF	Testis Determining Factor
TE	Tris-EDTA
Th	Température D'hybridation
Tm	Température De Fusion
Tr	Tour
TSPYL1	Testis-Specific Proteiny-Like-1
UV	Ultra Violet
V	Volume
WNT4	Wingless-type MMTV Intergration Site Family, Member4
WT1	Wilms Tumor 1
Δ4	Delta 4-Androstènedione
Δ5	Delta 5-Androstènedione

Liste des tableaux

Tableau 14: Résultats du caryotype

55

Liste des figures

Figure	page
Figure 1 : Spermatogenèse	4
Figure 2 : Ovogenèse	4
Figure 3: Résultat de fécondation d'un ovule X par un spermatozoïde X ou Y	5
Figure 4: Schéma d'un embryon de trois semaines	6
Figure 5: Coupe transversale schématique de la région lombaire d'un embryon de six semaines	6
Figure 6 : Schémas de l'appareil génital au stade indifférencié	7
Figure 7 : Coupe transversale de testicule	8
Figure 8 : Coupe transversale d'ovaire	8
Figure 9 : Diagramme des voies génitales masculines	9
Figure 10 : Schéma des voies génitales féminines	10
Figure 11: Chromosome X avec les différents gènes	11
Figure 12: Structure du chromosome Y	11
Figure 13: Organisation du gène et de la protéine de WT1	12
Figure 14: Boîte HMG du gène SRY	14
Figure 15 : Modèle du facteur Z	15
Figure 16: Représentation schématique de SF1	15
Figure 17: Représentation schématique de SOX9	16
Figure 18: Structure de WNT4	17
Figure 19 : Les différents gènes impliqués dans le processus de différenciation sexuelle	18
Figure 20: Chronologie simplifiée de l'interaction entre les gènes impliqués dans la différenciation sexuelle	19
Figure 21: Schéma représentant la régulation de l'AMH	20
Figure 22 : Cascade moléculaire de biosynthèse des androgènes	28
Figure 23: Mécanisme de l'action des androgènes	29
Figure 24: Traitement à la pepsine et lavages	43
Figure 25: Dépôt de la sonde	43
Figure 26: Création de la chambre d'hybridation	44
Figure 27: Séparateur magnétique	47
Figure 28: Caryotype du patient P1 (syndrome de Turner 45,X)	56
Figure 29: Caryotype du patient P2 syndrome de Turner en mosaïsme	56
Figure 30: Caryotype du patient P4 (femme XY)	58
Figure 31: Caryotype du patient P7 (45,X/46,XY)	59

Figure 32: Caryotype du patient P9 (homme XX)	60
Figure 33: Caryotype du patient P12 (syndrome de klinefelter)	61
Figure 34: Résultat de FISH du P8 montrant un spot vert et un spot orange	63
Figure 35: Résultat de FISH du P8 montrant un seul spot vert	63
Figure 36: Résultat de FISH du P7 montrant deux spot, vert et orange	64
Figure 37: Résultat de FISH du P7 montrant deux spot verts	64
Figure 38 : Résultat des conditions initiales de PCR SRY/DXS1684	66
Figure 39: Résultat PCR SRY/DXS1684, gamme de températures d'hybridation	67
Figure 40: Résultat PCR SRY/DXS1684, gamme de cycles	67
Figure 41: Résultat PCR SRY/DXS1684, gamme de concentrations	68
Figure 42: Résultat de PCR SRY/DXS1684 des patients	69
Figure 43: Carte de la sonde LSI SRY	70
Figure 44: Résultat de la PCR simplexe de SRY1 et SRY2 des patients P5 à P7	70
Figure 45: Exemple de résultat du séquençage	71
Figure 46: Alignement de SRY1 du P4	71
Figure 47: Alignement de SRY2 du P4	72
Figure 48: Résultat d'alignement de SRY1 du P5	73
Figure 49: Résultat de l'alignement de SRY2 du P5	73
Figure 50: Pic correspondant à l'insertion	73
Figure 51: Alignement de SRY1 du P6	74
Figure 52: alignement de SRY2 du P6	74

LIEU DE STAGE

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est situé au bâtiment J et conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales :

- ◆ Anatomie pathologique;
- ◆ Bactériologie-Immunoanalyses;
- ◆ Parasitologie;
- ◆ Biochimie et pharmaco-toxicologie;
- ◆ Hématologie;
- ◆ Génétique médicale et biologie moléculaire.

Il se compose de :

- ✚ Salle de réception;
- ✚ Salle de prélèvements;
- ✚ Laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie;
- ✚ Laboratoire d'hématologie;
- ✚ Laboratoire de bactériologie /Immunologie;
- ✚ Laboratoire de parasitologie;
- ✚ Laboratoire de génétique;
- ✚ Laboratoire d'anatomie pathologique

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique UGMO, représente une première expérience dans un CHU au MAROC, elle est activement mise en place depuis sa création en Mars 2009.

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique est subdivisée en trois disciplines qui assurent des activités variées:

- ✚ Génétique clinique (activité clinique)
 - Consultation de génétique (au centre du diagnostic)
 - Conseil génétique (au centre du diagnostic)
 - Consultation d'oncogénétique (au centre du diagnostic)
 - Avis du médecin généticien dans les services cliniques
 - Hôpital de jour (en coordination avec les services cliniques)
- ✚ Génétique chromosomique (analyse des chromosomes)
 - Cytogénétique classique (caryotype)
 - Cytogénétique moléculaire (FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence)
- ✚ Génétique moléculaire (analyse des gènes)

INTRODUCTION

La différenciation sexuelle d'un individu est déterminante pour son identité. Elle conditionne sa fonction sociale, familiale, et ses possibilités de reproduction. Elle représente également tout un processus anatomo-physiologique qui permet la constitution du phénotype à partir d'un génotype initialement mis en place par fécondation, selon un enchaînement d'événements contrôlés par des facteurs génétiques et hormonaux.

Cependant, plusieurs anomalies peuvent siéger à chacune des étapes de ce processus, et entraîner ainsi, des troubles de différenciation sexuelle ou DSD (disorders of sex development) qui peuvent être détectés en stade prénatal lors de consultation systématique de gynécologue (via l'échographie) ou souvent constatés clairement à la naissance, tels que les ambiguïtés sexuelles. D'autres troubles passent inaperçus pendant l'enfance et n'apparaissent qu'en stade adulte, c'est le cas des patients qui se présentent pour aménorrhée primaire ou pour retard pubertaire, ou encore pour stérilité.

La survenue de ces troubles de différenciation sexuelle concerne un à deux individus sur 10.000 nouveaux nés (Mark Woodward, 2010)*, et constitue toujours un véritable drame aussi bien pour les familles que pour les patients qui se précipitent de réaliser tous les analyses et tests nécessaires pour comprendre leur maladie. Mais finalement dans la plupart des cas, les examens classiques que ce soient cliniques, biologiques ou radiologiques, n'aboutissent toujours qu'à la détection de l'anomalie sans pouvoir décider de l'étiologie ni du diagnostic définitif, chose que seul la médecine génétique peut déceler grâce au progrès de la biologie moléculaire qui a offert des examens plus explicits.

Le travail présent va permettre d'une part, de vérifier la pertinence des techniques de cytogénétique constitutionnelle et moléculaire dans le diagnostic et la prise en charge des troubles de différenciation sexuelle, et d'autre part de valider un nouveau examen moléculaire au sein de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU HASSAN II de Fès et de vérifier son efficacité dans l'amélioration de la qualité et de la spécificité du diagnostic. Le but étant de permettre à l'équipe multidisciplinaire, chargée de suivi du patient, de prendre la bonne décision et de mettre en place la meilleure stratégie thérapeutique qui permettra au patient et à sa famille de subir le minimum des dégâts et de vivre une vie très naturelle.

Pour y arriver, on va dans une première partie, illustrer le processus de différenciation sexuelle en stade embryonnaire et les facteurs impliqués ainsi que les différents troubles pouvant survenir au cours de ce processus, tout en essayant le maximum possible d'éclaircir les mécanismes moléculaires qui permettraient à un tel ou tel phénotype de s'installer, y compris les conséquences et les solutions possibles.

La deuxième partie sera consacrée à l'étude concrète d'une série diversifiée de patients souffrant de troubles de différenciation sexuelle divers qui se sont présentés à l'unité de

génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II de Fès. L'étude va se focaliser, d'une part, sur le côté diagnostic cytogénétique par établissement du caryotype et d'hybridation in situ fluorescente (FISH) afin de préciser la constitution du matériel chromosomique du patient et de déceler la présence de toute anomalie de nombre ou de structure, et d'autre part, la mise au point de la technique d'amplification par polymérisation en chaîne du gène de déterminisme sexuel SRY et l'exploration de sa présence et de son intégrité chez certains cas.

L'objectif global étant de prouver l'intérêt de la biologie moléculaire et de la génétique dans le soutien du domaine médical.

*Mark Woodward, Nitin Patwardhan. Disorders of sex development. PAEDIATRIC SURGERY II 28 (8) (2010) 396-401

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralité

1. Historique

Les premiers raisonnements génétiques ont débuté avec la théorie chromosomique de l'hérédité, qui est fondée sur l'hypothèse des lois de Mendel. C'est à la même époque que l'on commença à mettre en évidence des différences chromosomiques entre l'homme et la femme.

Ramon y. Cajal décrit un corpuscule présent dans les cellules femelles, corpuscule qui sera caractérisé par ML Barr (1948) pour porter finalement son nom. Puis, dans les années 1960, la cytogénétique permet la caractérisation des chromosomes humains grâce à la réalisation des caryotypes par marquage en bandes. Ensuite c'est l'étude des patients présentant des discordances entre leur formule chromosomique et leur sexe phénotypique qui a permis finalement l'identification des principaux déterminants génétiques.

Actuellement, grâce aux progrès de la biologie moléculaire, de nombreux gènes ont été prouvés impliqués dans la cascade moléculaire du déterminisme sexuel et dont la déficience entraîne les discordances et les ambiguïtés initialement observées sur le plan phénotypique [1].

2. Rappel

L'être humain possède dans le noyau de chacune de ses cellules 46 chromosomes, dont 22 paires d'autosomes, numérotés de 1 à 22 et une paire de chromosomes sexuels ou gonosomes appelés X et Y.

La spermatogenèse se fait suite à deux divisions méiotiques (M1 et M2). Un spermatocyte de 1er ordre donne ainsi naissance à 4 spermatozoïdes haploïdes, deux avec un chromosome X et deux avec un chromosome Y. Les spermatozoïdes sont donc déterminants quant au sexe des descendants (figure 1).

L'ovogenèse se fait comme la spermatogenèse, suite à deux divisions méiotiques (M1 et M2). Il n'en résulte qu'un ovule fécondable et trois globules polaires tous haploïdes. Il faut ajouter que la méiose n'est achevée qu'au moment de la fécondation, sinon elle reste bloquée en métaphase de la deuxième division méiotique [2] (figure 2).

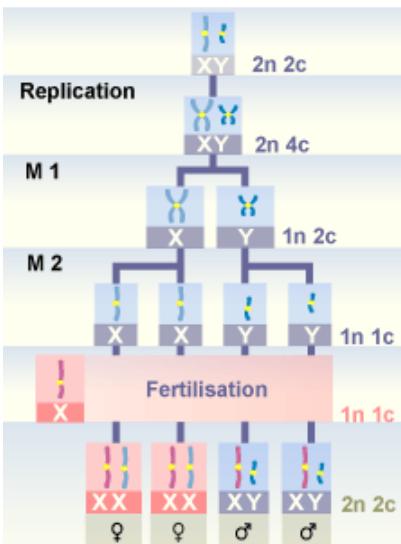


Figure 1: Spermatogenèse d'après
[www.embryology.ch/francais/
 ugenital/planmodgenital.html](http://www.embryology.ch/francais/ugenital/planmodgenital.html)
 M1: méiose I, M2: méiose II

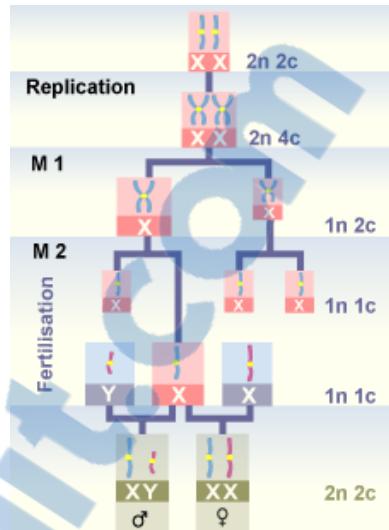


Figure 2 : Ovogenèse d'après
[www.embryology.ch/francais/
 ugenital/planmodgenital.html](http://www.embryology.ch/francais/ugenital/planmodgenital.html)
 M1: méiose I, M2: méiose II

II. Différenciation sexuelle

1. Définition

La différenciation sexuelle fœtale est un processus qui dépend d'un ensemble de signaux cellulaires et hormonaux qui interagissent entre eux, dans un ordre précis pour contribuer à la mise en place de l'appareil génital et à l'établissement d'un phénotype masculin ou féminin [3]. On distingue deux notions majeures:

- La **détermination sexuelle** qui permet l'engagement de l'ébauche gonadique (ou crête génitale) dans une voie de développement conduisant à la formation d'un testicule ou d'un ovaire, constituant ainsi le sexe gonadique.
- La **différenciation sexuelle** proprement dite qui est le processus permettant le développement du tractus génital et organes génitaux externes appropriés, en réponse à des signaux hormonaux constituant alors le sexe phénotypique [1].

Ainsi, on distingue, chronologiquement, 4 étapes séquentielles majeures:

- Établissement, par fécondation, du **sexe génétique** féminin 46,XX ou masculin 46,XY.
- La mise en place du **sexe gonadique** par développement des gonades fœtales bipotentielle en testicule ou ovaire.
- La production d'hormones capitales pour le développement du phénotype.
- Le développement du **sexe phénotypique** correspondant à la différenciation des organes génitaux externes et du sinus urogénital [3].

2. Processus physiologique

a) Sexe génétique

Au cours de la spermatogénèse, la méiose assure la ségrégation des chromosomes X et Y dans deux populations de spermatozoïdes porteurs pour 50 % de chromosome X et pour 50 % de chromosome Y. L'assortiment XX ou XY au moment de la fécondation détermine le sexe génétique avec un sex-ratio de 1 (figure 3). Le chromosome Y a un effet "dominant" dans le déterminisme sexuel quel que soit le nombre de X présents [4].

Ainsi, au début de la gestation (1^{ère} et 2^{ème} semaine), les embryons des deux sexes ne diffèrent que par leurs génotypes.

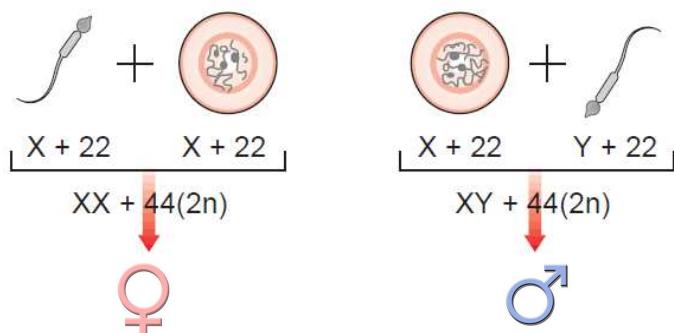


Figure 3: Résultat de fécondation d'un ovule X par un spermatozoïde X ou Y.

A la suite de la détermination génétique du sexe, les ébauches neutres vont se développer et se différencier, avec le concours d'autres gènes régulateurs, en un des deux types de gonades [2].

b) Le stade indifférencié

i. La morphogénèse des gonades

Malgré le dimorphisme chromosomique, aucune différence morphologique n'est décelable entre les gonades, les voies génitales et les organes génitaux externes des embryons de sexe féminin et masculin entre la 3^e et la 6^e semaine (stade indifférencié) [4].

Les gonades apparaissent chez l'embryon de quatre semaines sous forme d'une crête longitudinale bilatérale dite crête génitale (ou crête gonadique), située de part et d'autre de la ligne médiane [5].

Les gonades sont formées par deux populations cellulaires d'origine embryologique totalement différentes.

- les cellules germinales primordiales (PGC = primordial germ cells) destinées à former les gamètes (spermatozoïdes et ovocytes).
- les cellules somatiques ou nourricières qui vont entourer les cellules germinales.

Les **cellules germinales primordiales** (PGC) apparaissent dans l'épiblaste dès la gastrulation [6,7], et subissent une première **migration extraembryonnaire** (figure 4 A) et une deuxième **migration intraembryonnaire** (figure 4 B) pour finalement coloniser les crêtes

génitales. Durant leur migration, qui s'effectue entre la 4^e et la 6^e semaine, ces cellules continuent à se multiplier par mitoses [2].

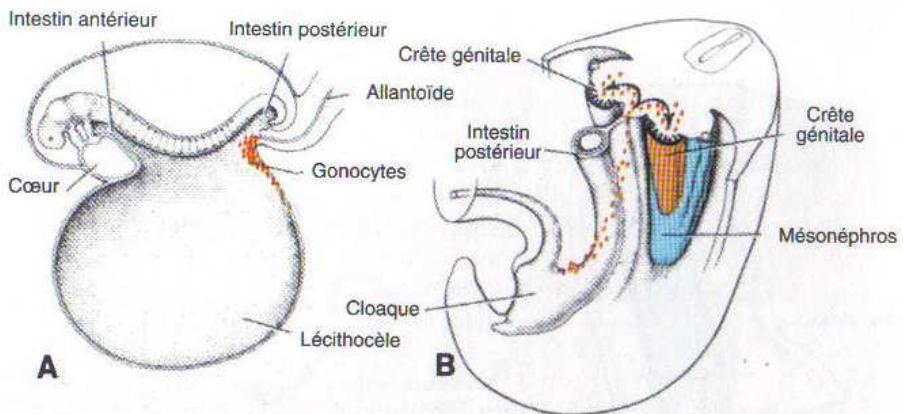


Figure 4: A. Schéma d'un embryon de trois semaines montrant la migration extraembryonnaire des gonocytes ; B. dessin représentant la migration des gonocytes le long de la paroi de l'intestin postérieur vers la crête génitale. D'après Jan Langman, T.-W.Sadler. Langman's Essential Medical Embryology. Lippincott Williams & Wilkins 2004.

A la sixième semaine, les PGC pénètrent dans les crêtes génitales.

Peu avant et pendant l'arrivée des PGC dans la crête génitale, l'épithélium Cœlomique prolifère activement et envahit le mésenchyme sous-jacent. Les cellules épithéliales se multiplient pour former un certain nombre de cordons de formes irrégulières: les cordons sexuels primitifs (figure 5) [5].

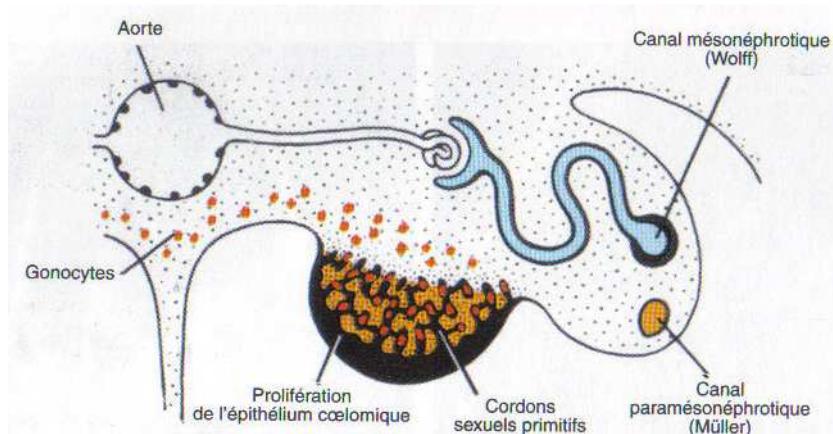


Figure 5: Coupe transversale schématique de la région lombaire d'un embryon de six semaines, montrant la gonade indifférenciée et les organes sexuels primitifs (quelques gonocytes entourés de cellules des cordons sexuels primitives. D'après Jan Langman, T.-W.Sadler. Langman's Essential Medical Embryology. Lippincott Williams & Wilkins 2004.

À ce stade, cette ébauche gonadique est indifférenciée. Les cellules germinales primordiales sont également bipotielles et peuvent entrer soit en spermatogenèse soit en ovogénèse selon la nature de leur environnement [8,9].

ii. Les voies génitales

Parallèlement au développement des gonades, Le mésonéphros et l'épithélium cœlomique vont donner lieu, entre la 4^e et la 7^e semaine, à deux paires de conduits génitaux, de manière identique dans les deux sexes [10, 11]. Il s'agit d'une part, des **canaux de Wolff** ou canaux mésonéphrotiques qui sont connectés par leur partie supérieure aux structures mésonéphros-gonades et débouchant par leur partie inférieure dans le cloaque; et d'autres part, des **canaux de Müller** ou canaux paramésonéphrotiques qui sont formés par une invagination de l'épithélium cœlomique, ainsi ils sont ouvert à leur extrémité crâniale sur la cavité cœlomique (sans être connecté à aucune structure), alors qu'à leur extrémité caudale, ils fusionnent (les deux canaux homologues controlatérales) pour donner le canal utérovaginal [4]. (figure 6).

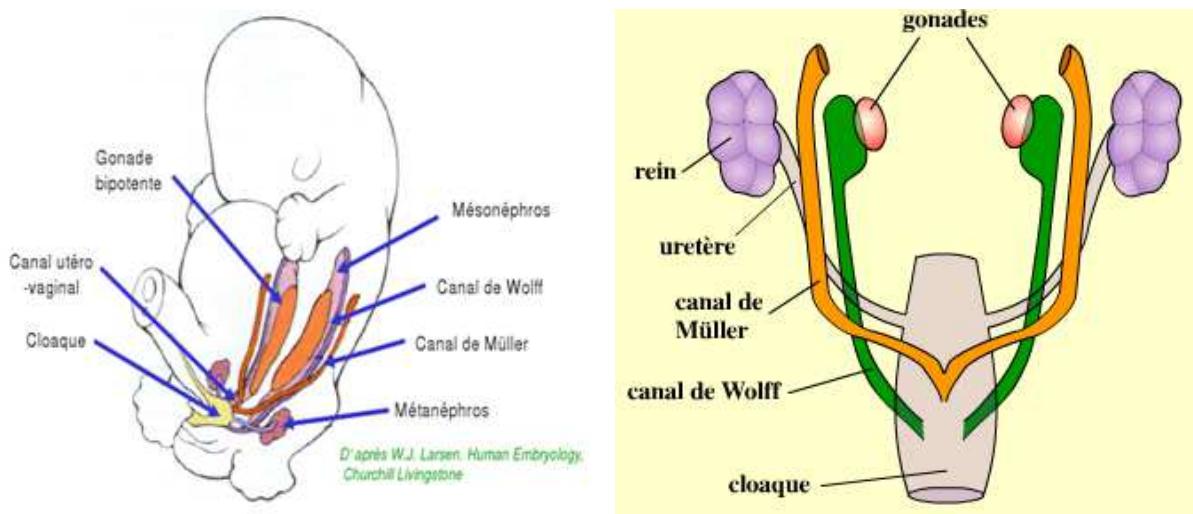


Figure 6 : Schémas de l'appareil génital au stade indifférencié montrant les gonades indifférenciées, les canaux de Wolff et les canaux de Müller.

c) Sexe gonadique

À partir de la 7^{ème} semaine les gonades vont se différencier soit en testicules, soit en ovaires selon le génotype, et le destin des canaux de Müller et de Wolff dépendra du résultat de cette différenciation.

A ce stade, différents facteurs génétiques vont intervenir selon les gonosomes présents [12].

i. Testicule

Si l'embryon est génétiquement masculin (avec formule chromosomique XY), l'effet testiculo-déterminant du chromosome Y dû à l'expression du gène SRY (qu'on va détailler plus loin), entraîne la différenciation testiculaire en provoquant l'apparition autour des cellules germinales de cordons épithéliaux (ébauches des futurs tubes séminifères). Les cellules germinales se retrouvent ainsi à l'intérieur des cordons séminifères, enchaînées dans **les cellules de Sertoli** qui les isolent du milieu extérieur (barrière sang-spermatozoïdes). A ce stade, les cellules germinales se divisent activement, mais n'entrent pas en méiose. Entre les cordons

séminifères, des cellules mésenchymateuses se différencient en **cellules interstitielles de Leydig** qui assurent la sécrétion endocrine du testicule [4] (Figure 7).

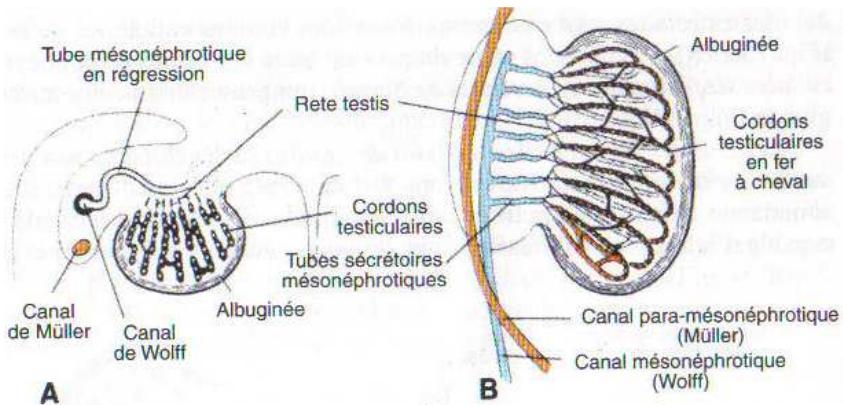


Figure 7 : A. Coupe transversale de testicule à la 8e semaine du développement, B. Représentation schématique du testicule et des canaux génitaux au cours du 4e mois (D'après Jan Langman, Sadler T.-W.. Langman's Essential Medical Embryology. Lippincott Williams & Wilkins. 2004)

ii. Ovaire

En absence du chromosome Y et donc du gène SRY responsable du déterminisme testiculaire, les cordons sexuels primitifs se dissocient en amas cellulaires irréguliers dans lesquels sont incluses les cellules germinales primaires. Contrairement à la gonade masculine, l'épithélium de surface prolifère sous forme de cordons corticaux qui envahissent le mésenchyme sous-jacent. Au quatrième mois, ces cordons se dissocient en amas cellulaires qui entourent une ou quelques cellules germinales primitives. Ensuite, les cellules germinales se différencient en ovogonies et les cellules d'origine épithéliale qui les entourent forment les cellules folliculaires [13] (Figure 8).

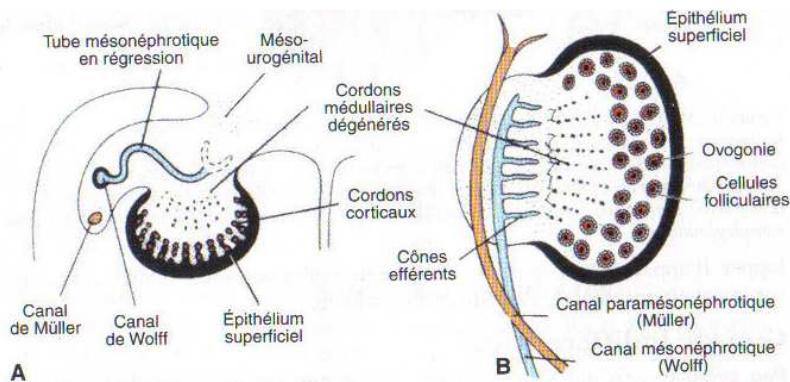


Figure 8 : A. Coupe transversale d'ovaire à la 7e semaine du développement, B. Schéma de l'ovaire et des canaux génitaux au 5e mois du développement montrant les ovogonies entourées de cellules folliculaires (D'après Jan Langman, T.-W.Sadler. Langman's Essential Medical Embryology. Lippincott Williams & Wilkins. 2004)

d) Sexe phénotypique

Après la détermination gonadique (50^e-60^e jour de gestation) peut commencer la différenciation sexuelle du tractus génital. Les conduits génitaux s'édifient à partir des canaux de Wolff et de Müller, alors que les organes génitaux externes dérivent du sinus urogénital, du

tubercule génital, des plis et bourrelets génitaux. Les travaux de Jost ont suggéré le rôle fondamental du testicule foetal dans l'établissement des structures mâles alors que durant la même période, l'ovaire lui, n'est pas nécessaire à la différenciation du tractus génital dans le sens féminin [14].

i. La voie masculine

Chez l'embryon au sexe gonadique masculin, le testicule va produire l'AMH (l'hormone anti-müllariene qui entraîne la régression des canaux de Müller [15], et de la testostérone, qui stimule le développement des organes génitaux internes à partir du canal de Wolff dont la partie supérieure forme l'épididyme, la partie moyenne devient le canal déférent et la partie terminale se transforme en vésicules séminales.

Le sinus urogénital, quant à lui fournit la partie antérieure de l'urètre et les glandes de Cooper [16, 17]. La conversion de la testostérone en DHT (dihydroxytestostérone) dans les tissus androgénodépendants via la 5 α-réductase, masculinise les organes génitaux externes, dès la neuvième semaine, ainsi, le tubercule génital se différencie pour donner le pénis et les corps caverneux. Les bourrelets génitaux fusionnent sur la ligne médiane pour constituer le scrotum et le raphé [15, 17,18] (Figure 9).

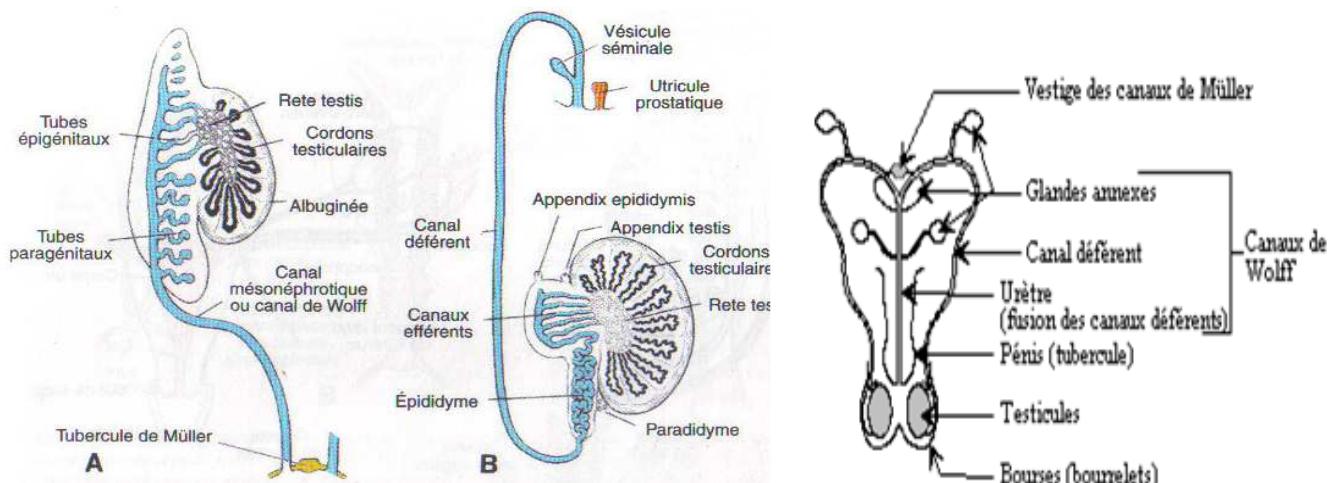


Figure 9 : A. Diagramme des voies génitales masculines au 4e mois du développement, B. Voies génitales après la migration du testicule, le schéma à droite montre l'appareil génital masculin évolué. (D'après Jan Langman, Sadler T.-W.. Langman's Essential Medical Embryology. Lippincott Williams & Wilkins; 2004)

ii. La voie féminine

Chez l'embryon féminin, l'absence de sécrétion d'AMH et de testostérone induit la régression spontanée des canaux de Wolff vers la 11^e semaine de gestation alors que les canaux de Müller vont se différencier en trompes, utérus et partie supérieure du vagin. Les portions inférieures fusionnées des deux canaux de Müller vont former un organe utérovaginal plein qui va petit à petit se creuser jusqu'à la 18^e semaine [19].

De même pour les organes génitaux externes, le développement se déroule spontanément en absence des androgènes testiculaires, ainsi, le sinus urogénital devient le

vestibule avec les glandes de Bartholin ; le tubercule génital devient le clitoris, les plis génitaux restent séparés en petites lèvres, les bourrelets forment les grandes lèvres [20] (Figure 10).

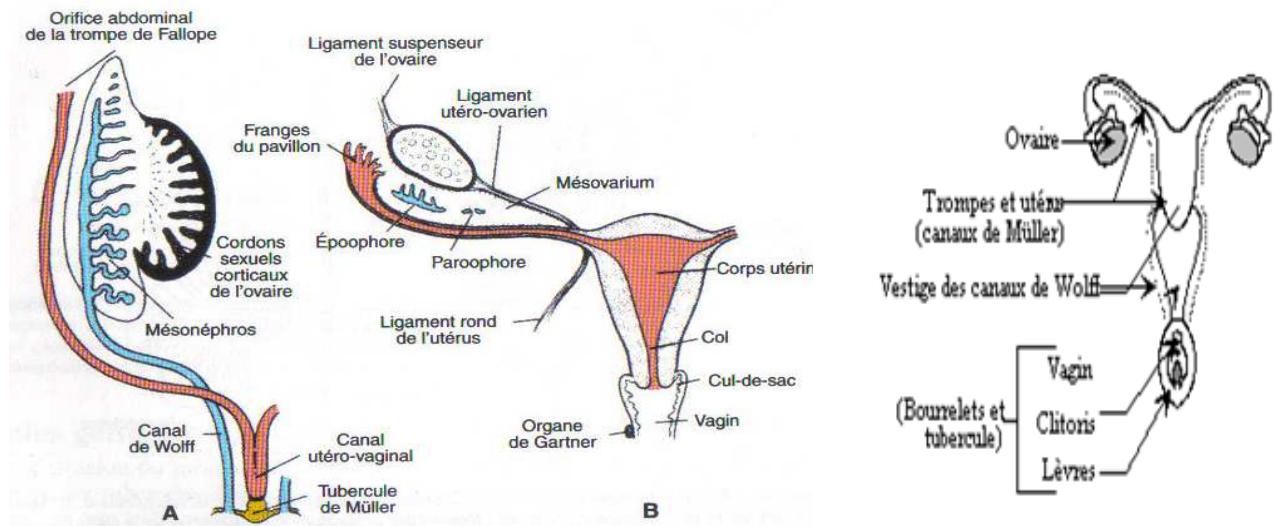


Figure 10 : A. Schéma des voies génitales féminines à la fin du deuxième mois du développement avec le canal de Wolff encore présent, B. Les voies génitales après la descente de l'ovaire, le schéma à droite représente les organes génitaux féminins évolués (D'après Jan Langman, Sadler T.-W.. Langman's Essential Medical Embryology. Lippincott Williams & Wilkins; 2004)

Le déroulement du processus physiologique de la différenciation sexuelle est déclenché, contrôlé et régulé par plusieurs facteurs, à savoir, les facteurs chromosomiques, les facteurs génétiques, et les facteurs hormonaux, au niveau desquelles l'anomalie engendre automatiquement un trouble de la différenciation sexuelle qui, souvent, se manifeste au niveau du phénotype.

3. Facteurs gonosomiques

On désigne par les facteurs gonosomiques, les chromosomes sexuels ou gonosomes, dont l'absence ou la présence en une ou plusieurs copies affecte fortement le phénotype (tableau I), il s'agit des chromosomes X et Y:

Le chromosome X (figure 11) est le grand chromosome métacentrique, de taille de 154 Mb, renfermant environ 931 gène et qui est présent dans les cellules masculines en un seul exemplaire et dans les cellules féminines en deux exemplaires (excepté bien évidemment les gamètes), pourtant, le deuxième chromosome X féminin n'aboutit pas à une «surproduction» des protéines du fait du mécanisme de l'inactivation que subit aléatoirement l'un des deux gonosomes féminins (paternel ou maternel) qui va se transformer en un amas d'hétérochromatine dite **corpuscule de Barr**, sauf dans certain cas d'anomalies où l'inactivation cible le X porteur d'anomalie au profit du deuxième X normal [21].

Cependant, 15% des gènes échappent à l'inactivation, notamment, les gènes de la région pseudo-autosomique PAR 1 et 2 commune à l'X et à l'Y, ainsi que les gènes situés principalement sur le bras court de l'X. certains de ces gènes ont un équivalent fonctionnel sur

l'Y, ce qui prouve la théorie de compensation du dosage entre le matériel génétique féminin et masculin [22].

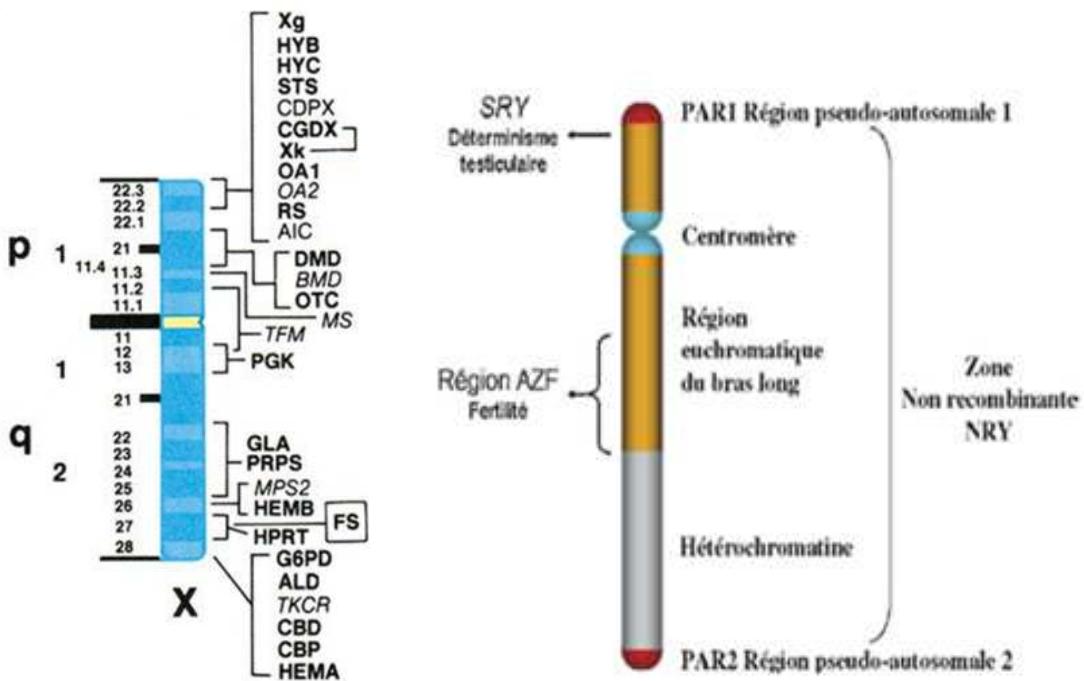


Figure 11: Chromosome X avec les différents gènes

Figure 12: Structure du chromosome Y

Le chromosome Y (figure 12) est le petit chromosome présent exclusivement et en une seule copie chez l'homme et représente 1,5% à 2% de l'ADN total, il s'étend sur environ 57 Mb renfermant 104 gènes [22] dont les deux fameux gènes mâle-spécifiques, le gène responsable de la spermatogénèse AZF, et le gène du déterminisme testiculaire SRY qui déclenche une cascade moléculaire d'activation/répression aboutissant à la différenciation des gonades en testicules pendant la vie embryonnaire (voir plus loin) [1].

Les études ont montré que, grâce à ce gène, quel que soit le nombre de chromosomes X, la différenciation se fait vers le sexe masculin lorsqu'un seul chromosome Y normal est présent [1], comme le montre le tableau 1:

Tableau 1: Relation génotype phénotype [1]

Formule chromosomique	Différenciation sexuelle	Phénotype
46,XX	Féminin	Femme
47,XXX	Féminin	Femme
45,X	Féminin	Syndrome de Turner (létalité embryonnaire fréquente)
46,XY	Masculin	Homme
47,XXY	Masculin	Syndrome de Klinefelter
47,XYY	Masculin	Disomie Y
46,XY q- ou 46,Xi(Yp)	Masculin	Infertilité masculine
46,XY p- ou 46,Xi(Yq)	Dysgénésie gonadique	Féminin
45,Y		Létal

Il faut noter que seule 5% du chromosome Y (à proximité des télomères) peut se recombiner avec le chromosome X, et que la zone autour des gènes déterminant le sexe est inhibée, de telle sorte qu'aucun crossing-over avec le chromosome X ne soit possible à cet endroit, sans cela, des incohérences sexuelles apparaîtraient trop fréquemment [22].

4. Facteurs génétiques

Outre les facteurs gonosomiques, le processus de la différenciation sexuelle est contrôlé par plusieurs gènes étalés aussi bien sur les autosomes que sur les gonosomes.

a) Stade indifférencié

Les principaux gènes impliqués dans le développement des gonades bipotentielles sont WT1, LHX9, GATA4.

WT1 (pour Tumor Wilms 1), le gène associé à la tumeur de Wilms, est localisé sur le bras court du chromosome 11 [20], il code pour des protéines à doigts de zinc, qui agissent comme des régulateurs transcriptionnels, notamment, WT1 +KTS et -KTS [15], l'isoforme +KTS paraît un régulateur important de SRY dans la détermination gonadique [23, 24], alors que l'isoforme -KTS peut activer le promoteur Sf1 in vitro et in vivo, comme l'avait démontré Wilhelm et Englert [25].

Au cours du développement, les deux isoformes de WT1 s'expriment dans la gonade bipotentielle puis dans les cellules de Sertoli du testicule et dans les cellules de la granulosa de l'ovaire [1], des études ont montré que WT1 est impliqué dans le développement précoce de la gonade [20], il a été suggéré, aussi, que WT1 serait responsable de la migration des cellules germinales primordiales de l'épithélium coelomique vers la crête génitale pour donner les cellules de Sertoli [26], des mutations hétérozygotes de WT1 ont été retrouvées chez des sujets associant des dysgénésies gonadiques XY avec des anomalies ou des tumeurs rénales (syndrome de Denys-Drash ou syndrome de Frasier) [27, 28].

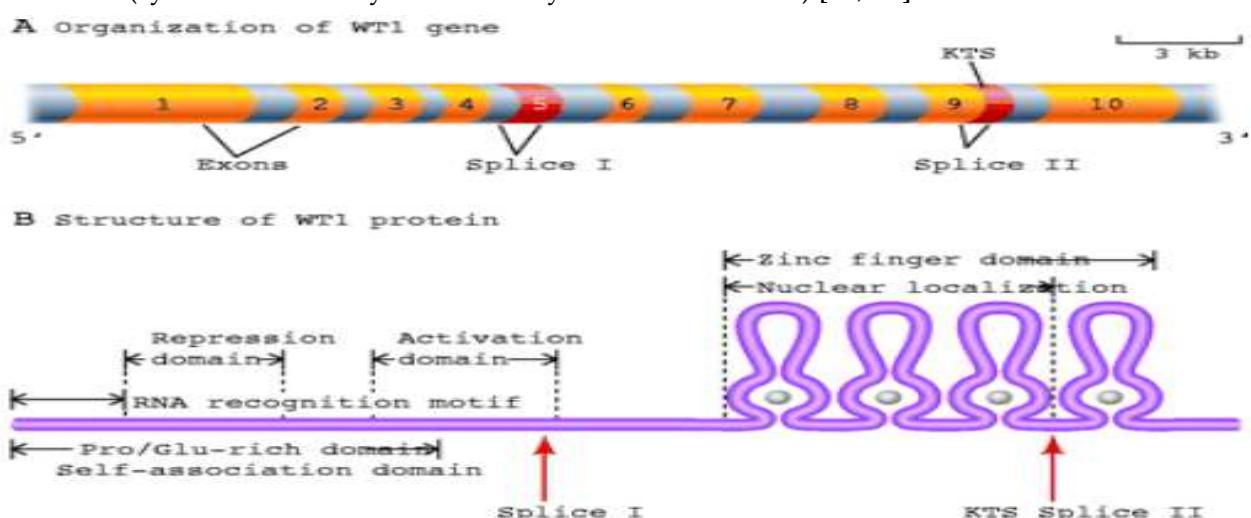


Figure 13: Organisation du gène et de la protéine de WT1 d'après Holger Scholz and Karin M. Kirschner. A Role for the Wilms' Tumor Protein WT1 in Organ Development. Physiology, Vol. 20, No. 1, 2005, 54-59.

■ **LHX9** est un gène homéotique qui s'exprime très tôt dans les crêtes urogénitales et, en son absence, ces cellules ne prolifèrent pas et il n'y aura pas formation de gonades [20]. Chez les sujets à crêtes génitales déficientes en Lhx9, l'expression du facteur stéroïdogénique 1 (Sf1), un récepteur nucléaire essentiel pour la gonadogénèse, est réduite à des niveaux minimaux, ce qui indique que Lhx9 peut se situer en amont de SF1 dans la cascade de développement. Les mutants en Lhx9 ne présentent pas d'autres grands défauts de développement [29].

■ **Le gène GATA4** code pour un facteur de transcription et s'exprime dès 11,5 jpc dans les cellules somatiques des crêtes génitales. Il régulerait l'expression de différents gènes exprimés dans les gonades codant pour des enzymes de la stéroïdogenèse, l'inhibine alpha et l'AMH [30]. Il est impliqué également dans la détermination sexuelle [31]. Des mutations dans GATA-4 ont été associées à des malformations auriculaires septales du cœur ainsi qu'à des ambiguïtés génitales de certains individus 46,XY [32].

■ **Les gènes emx2 et PAX2** sont également impliqués dans la formation précoce de la gonade bipotentielle [32].

b) Différenciation des testicules

La différenciation des testicules est régie principalement par le fameux gène SRY ainsi que par SF1 et SOX9.

■ **Le gène du déterminisme testiculaire SRY** (sex-determining region of the Y), initialement appelé TDF (testis determining factor), a tiré sa nomenclature de son rôle crucial dans la détermination du sexe masculin qui était recherché dès 1966 par Jacobs et Ross [33], et finalement prouvé en 1990 par la mise en évidence d'une mutation ponctuelle chez une femme XY [34, 35]. Le gène SRY est localisé sur le chromosome Yp11.32 au niveau du bras court près de la région pseudoautosomique, il code pour un facteur de transcription de 204 acides aminés, renfermant un motif de 79 acides aminés qui présente une homologie avec les protéines de la famille HMG (High Mobility Group) (figure 14). Cette boîte HMG correspond à un domaine de liaison à l'ADN [1]. Les premières études ont révélé que SRY est exprimées peu de temps après l'émergence des crêtes génitales par l'action de WT1 et SF1, les précurseurs des cellules de Sertoli sont les premiers types cellulaires où SRY s'exprime [15, 36], en effet, SRY jette clairement une commande moléculaire pour engager une cascade d'événements moléculaires « mâle-spécifique », mais la continuité de l'expression de SRY n'est pas requise pour le déroulement de ces événements.

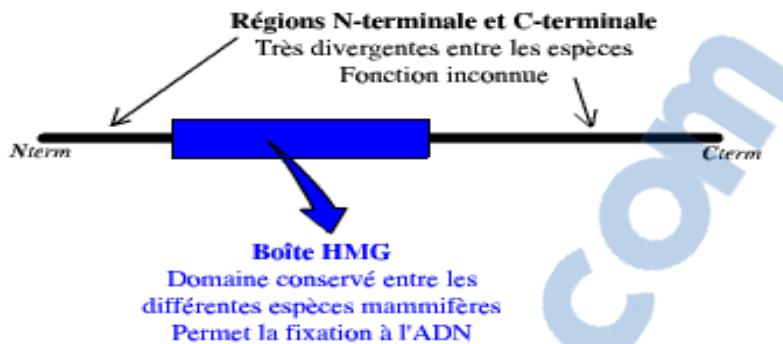


Figure 14: Boîte HMG du gène SRY

Le domaine HMG, joue un rôle central, étant la seule région conservée entre les espèces et le site de presque toutes les mutations cliniques causant des dysgénésies gonadiques XY [32]. En effet, Des analyses structurales fines ont montré qu'après liaison via la boîte HMG, l'ADN cible subit un changement profond de conformation et il y aura une courbure de 70-80° qui va permettre le rapprochement et l'interaction entre des facteurs de transcription présents sur le gène cible de SRY et qui sont, à l'état normale, éloignés les uns des autres [36].

En ce qui concerne sa cible, Il semble que SRY agit sur un seul gène, *Sox9*, dont l'expression est alors rapidement renforcée par des boucles de régulation positive, SOX9 entraîne alors la formation des cellules de Sertoli et, par conséquent, la différenciation des testicules. Si SRY est absent ou muté, *Sox9* est réduit au silence, ce qui cède au développement des cellules folliculaires et à la formation de l'ovaire. [32]

Certaines mutations de SRY causent des **femmes 46,XY** avec dysgénésie gonadique pur [37], pourtant, les troubles de différenciation sexuelle en relation avec le gène SRY ne sont pas toujours dus à des mutations. En fait, l'existence du gène SRY dans un endroit très proche à la région pseudoautosomique PAR1 (qui subit obligatoirement des recombinaisons avec son homologue sur l'X) le rend capable de se transloquer sur l'X dans une recombinaison aberrante ce qui explique 90 % des **males 46,XX** [34, 38, 39].

Cependant, pour expliquer le cas des hommes XX à SRY négative et celui des femmes XY à SRY positive, McElreavey et al. ont proposé une hypothèse de double répression dans la voie du déterminisme testiculaire selon laquelle, SRY antagoniserait un facteur Z, non encore identifié, lui même responsable de blocage des gènes mâle-spécifique. Ainsi **les hommes XX à SRY négatif** pourraient présenter une mutation récessive de ce gène Z qui l'empêcherait alors d'inhiber la voie de différenciation testiculaire, et **les femmes XY à SRY positif** (non muté) pourraient, quant à elles, présenter une mutation de ce gène Z le rendant insensible à l'action de SRY, ce qui entraînerait le maintien de la répression des gènes testiculaires (figure 15) [40]. Mais, à ce jour, aucune véritable expérience n'a encore permis de vérifier cette théorie.

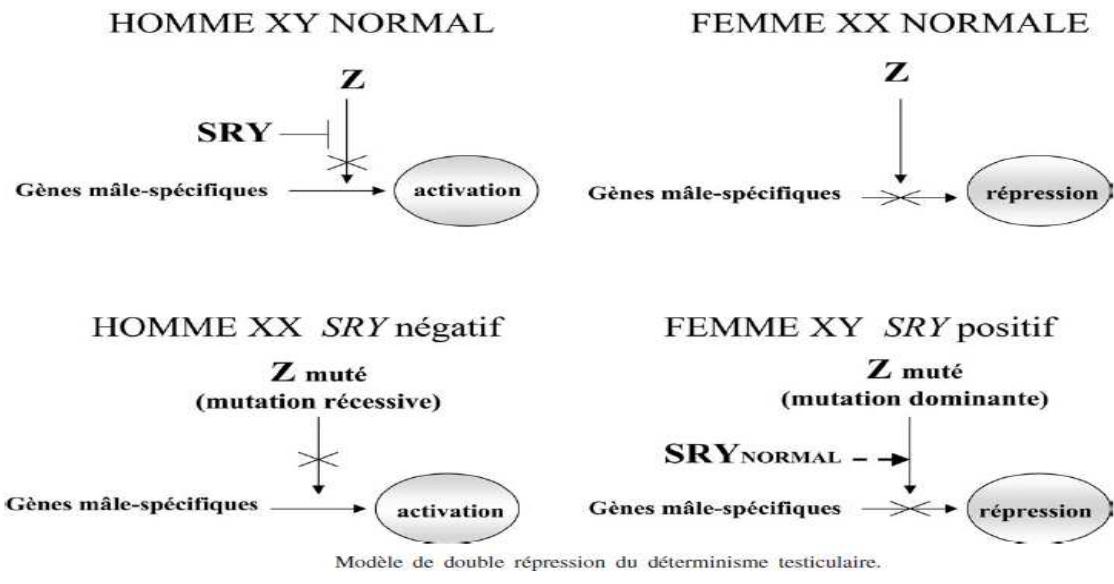


Figure 15 : Model du facteur Z [1]

■ Le facteur SF1 (Steroidogenic Factor 1) dont le gène est localisé en 9q33, est un membre de la famille des récepteurs nucléaires orphelins. C'est un facteur de transcription, dont le domaine de liaison à l'ADN est formé de deux doigts de zinc et dont l'extrémité C-terminale contient un domaine riche en proline, souvent retrouvé dans les domaines d'activation de la transcription [41].



Figure 16: Représentation schématique de SF1 (à droite les doigts de zinc de SF1) d'après Lin Lin, Pascal Philibert et all. Heterozygous Missense Mutations in Steroidogenic Factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) Are Associated with 46,XY Disorders of Sex Development with Normal Adrenal Function. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism March 1, 2007 vol. 92 no. 3 991-999.

Le profil d'expression de SF-1 est compatible avec son rôle central dans la régulation de la détermination et de la différenciation des gonades [32]. En effet, l'expression de SF-1 a été démontrée dans les gonades bipotielles dès le jour 32-33 post-conception [42, 43]. Ensuite, chez le mâle au début de la formation des testicules (dès approximativement 42 jour) l'expression de SF-1 est systématiquement maintenue dans les cellules somatiques, où il peut jouer un rôle crucial avec SRY dans le soutien de l'expression de SOX9 [44]. Dans les cellules de Sertoli, SF-1 active l'expression de l'AMH à 7 semaines de gestation, ce qui conduit à la régression des structures de Müller chez le mâle foetus en développement. Alors que dans les cellules Leydig, SF-1 active l'expression du systèmes enzymatiques stéroïdogènes à 8 semaines de gestation, ce qui engendre l'androgénisation des organes génitaux externes [32]. Chez les femelles, l'expression persistante de SF-1 a été signalée dans

le début du développement de l'ovaire chez l'humain [43]. Toutefois, le rôle exact que joue SF-1 dans l'ovaire n'est pas clair.

Les mutations dans le gène codant pour SF1 aboutissent à un spectre phénotypique assez large allant d'une dysgénésie testiculaire avec des structures de Müller, jusqu'aux ambiguïtés génitales [45]. Bien qu'il est non essentiel pour la détermination de l'ovaire [46], les mutations hétérozygotes de SF1 ont récemment été liées à une insuffisance ovarienne chez la femme [47].

■ Le gène SOX 9 (SRY- related box9), localisé sur le chromosome 17q24, appartient à la famille de gènes SOX (SRY-related box) ayant un rôle de facteur de transcription durant l'embryogenèse. Ce gène code pour une protéine de 509 acides aminés contenant une boîte HMG et présentant 71 % d'homologie avec SRY et un domaine de transactivation en C-terminal.

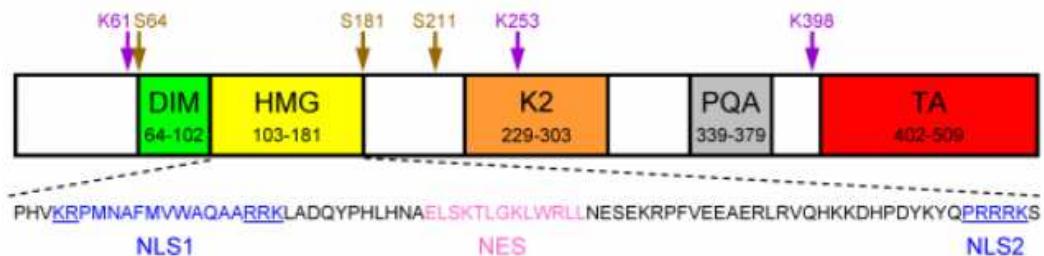


Figure 17: Représentation schématique de SOX9 d'après Ralf Kist. *Sox9 Mus musculus SRY-box containing gene 9. A worldwide collaboration of transcription factor experts www.cisreg.ca/tfe/*

SOX9 s'exprime tout au long du développement des cellules de Sertoli. Il serait impliqué dans l'initiation et le maintien de l'expression des gènes spécifiques de ces cellules [1]. SF1 est un bon candidat pour l'initiation ou la sensibilisation de l'expression de Sox9 au niveau des crêtes génitales des deux sexes car cette expression est annulée dans des gonades dont le Sf1 est muté [48, 49]. Ensuite, Sox9 est régulée à la hausse chez le mâle par l'action de SRY avec SF1, alors qu'il est régulé à la baisse chez la femelle en raison de l'absence de SRY. Après l'arrêt de l'expression transitoire de SRY, des niveaux élevés de SOX9 ont été maintenus par son autorégulation directe et via la signalisation de FGF9 [32]. Un homme XX qui présentait une large duplication du chromosome 17 incluant SOX9 a été le premier exemple d'une réversion sexuelle non causée par SRY chez l'homme [50]. Cela confirme d'une part, que SOX9, comme SRY, est capable d'induire le développement mâle chez un individu XX [1], et montre, d'autre part, l'importance du dosage d'expression génique [20].

■ Le gène CBX2 a été identifié comme agent essentielle pour le développement normal des gonades masculines humaines, et l'on a suggéré qu'il se trouve en amont de SRY dans la cascade du développement sexuel. Des études fonctionnelles ont démontré que CBX2

muté ne se lie pas correctement au gène cible et ne régule pas suffisamment l'expression de ces gènes cibles tels que SF1, qui sont essentiels pour le développement du sexe [51].

■ Les gènes DMRT1, DHH, ATRX, TSPYL1, MAMLD1 et PGD2S sont également impliqués dans la différenciation testiculaire, pour plus de détail consulter l'article [32].

c) La différenciation des ovaires

On pensait traditionnellement que la détermination gonadique dans le sens ovarien se produisait simplement en l'absence de déterminant testiculaire (par défaut), pourtant certains gènes se sont avérés primordiaux pour la différenciation normale des ovaires, notamment, DAX1, WNT4, RSPO1, FOX L2.

■ Le gène **DAX1** (DSS-AHC critical region on human X chromosome gene 1) localisé à l'intérieur du locus DSS au niveau de l'Xp21, code pour un récepteur nucléaire orphelin, ce gène régulé par WT1 est exprimé précocement dans la gonade bipotentielle, Son expression disparaît ensuite dans la gonade mâle, mais reste maintenue dans la gonade féminine [1, 20]. Des études ont montré que DAX1 se lie à SF1 pour le réprimer dans les gonades indifférenciés et les tissus stéroïdiens [32]. DAX 1 est également un inhibiteur de l'expression de SRY qui entraîne l'inversion du sexe, toutefois, cette inhibition ne s'exerce que si l'expression de SRY est faible (ce qui est démontré chez la souris) ou en cas de surexpression de DAX-1 (comme le cas de duplication), Ceci suggère une dépendance de dosage d'expression génique. Les mutations de ce gène sont responsables de l'hypoplasie congénitale des surrénales [52, 53].

■ Le gène **WNT4** (Wingless-Type MMTV integration site family, member 4) Localisé en 1p35, code pour une molécule de signalisation extracellulaire, cette protéine est produite dans les cellules somatiques de l'ovaire (cellules pré-granulosa).

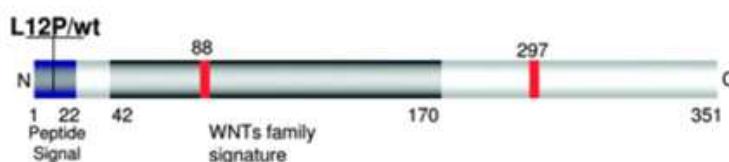


Figure 18: Structure de WNT4 d'après Pascal Philibert, Anna Biason-Lauber. Identification and Functional Analysis of a New WNT4 Gene Mutation among 28 Adolescent Girls with Primary Amenorrhea and Müllerian Duct Abnormalities: A French Collaborative Study. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism March 1, 2008 vol. 93 no. 3 895-900

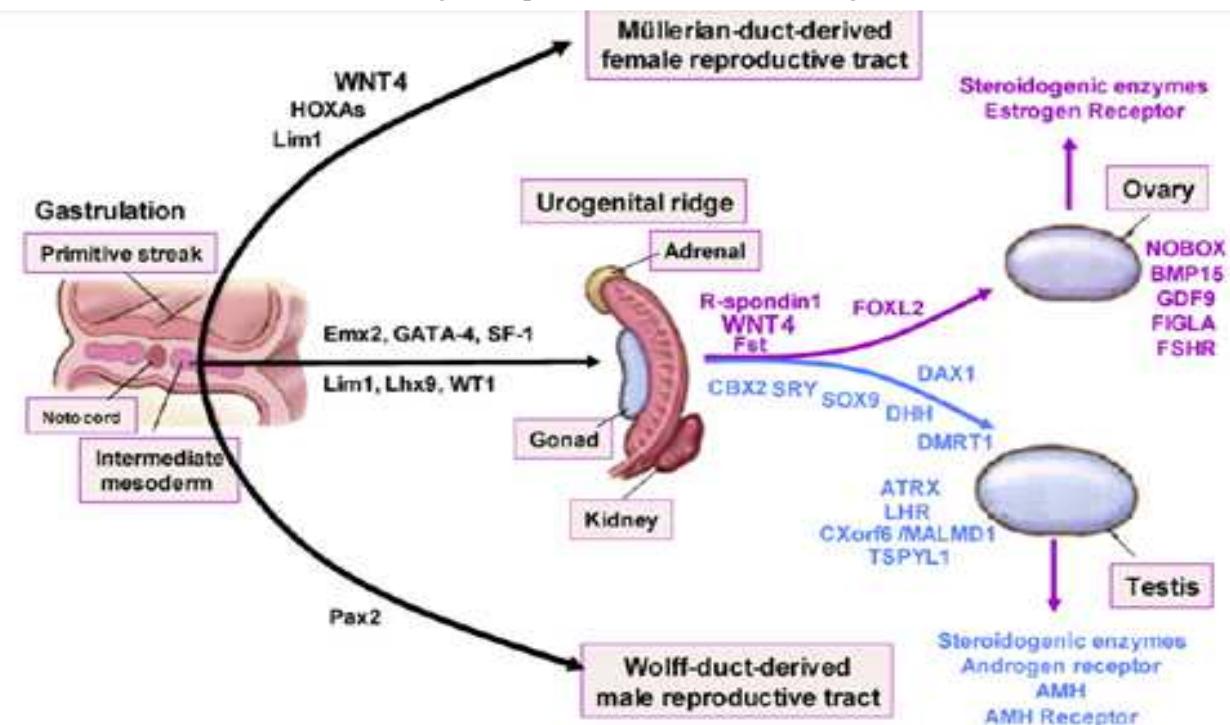
Jordan et al. ont montré que dans les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig, WNT4 régulait positivement DAX1. Ils ont ainsi proposé une explication possible à une réversion sexuelle XY associée à une duplication de la région 1p35-p31 incluant WNT4. La surexpression de WNT4, conduisant à une sur-régulation de DAX1, entraînerait un

phénotype féminin XY, c'est une inversion sexuelle masculin-féminin [54]. Les deux gènes *DAX1* et *WNT4* seraient donc partenaires dans le contrôle du développement féminin et dans la prévention de la formation testiculaire. Ils pourraient donc être des constituants du répresseur Z précédemment décrit ou agir en synergie avec lui [1] lorsque les deux copies du gène sont inactives, comme dans le cas de mutations homozygotes, il en résulte le syndrome Serkal caractérisé par une inversion sexuelle femelle-mâle avec des organes génitaux ambigus, une morphologie des gonades allant de ovotesticules aux testicules normales, agénésie rénale et une hypoplasie des surrénales [54].

■ **FOXL2** est un gène à unique exon codant pour un facteur de transcription [56]. Chez les vertébrés, **FOXL2** est l'un des premiers marqueurs connus de la différenciation de l'ovaire [57]. Ainsi, elle peut jouer un rôle dans la phase précoce de développement du compartiment somatique ovarien. Malgré l'importance de **FOXL2** dans le développement et le maintien de l'ovaire, seuls quelques unes des cibles internationales de transcription ont été décrites à ce jour [58, 59].

■ D'autres gènes et protéines sont impliqués dans la différenciation des ovaires mais moins connus, notamment, **β -catenine**, **RSPO1**, **BMP15**, **GDF9** et **NOBOX**, dont les mutations entraînent une insuffisance ovarienne prématuée [32].

N.B: les différents facteurs génétiques sont résumé sur la figure 19.



Modified from McLaughlin, NEJM 2004, 350: 367

Figure 19 : Les différents gènes impliqués dans le processus de différenciation sexuelle

d) Interaction entre les différents gènes

Après la mise en place de la crête génitale bipotential par plusieurs gènes, l'expression précoce de SF1 et WT1 initie aussi celle de Sox9 dans les deux sexes.

La β -caténine commence également à s'accumuler en tant que réponse à RSPO1 et Wnt4. Dans les cellules XX, les niveaux de β -caténine s'accumulent pour réprimer l'activité SOX9. Dans les cellules XY, la contribution de CBX2, qui augmente le niveau de SF1 active l'expression de Sry, cette dernière avec SF1, augmente l'expression de Sox9. CBX2 influence directement l'expression de SF1 et peut le faire indirectement en supprimant la répression DAX1 sur SF1. Une fois les niveaux de SOX9 atteignent un seuil critique, plusieurs boucles de régulation positive sont lancées, y compris l'autorégulation de son propre expression. SOX9 favorise la voie des testicules, y compris l'activation d'AMH, et probablement il réprime également les gènes de l'ovaire Wnt4 et Foxl2. Si l'activité SRY est faible, lente ou tardive, elle ne parvient pas à stimuler l'expression de Sox9 avant que la β -caténine ne s'accumule à des niveaux suffisants pour le réprimer. A des stades plus tardifs, dans les gonades XX, FOXL2 augmente et peut maintenir la différenciation des cellules de granulosa (follicule) en réprimant l'expression de Sox9 [32] (Figure 20).

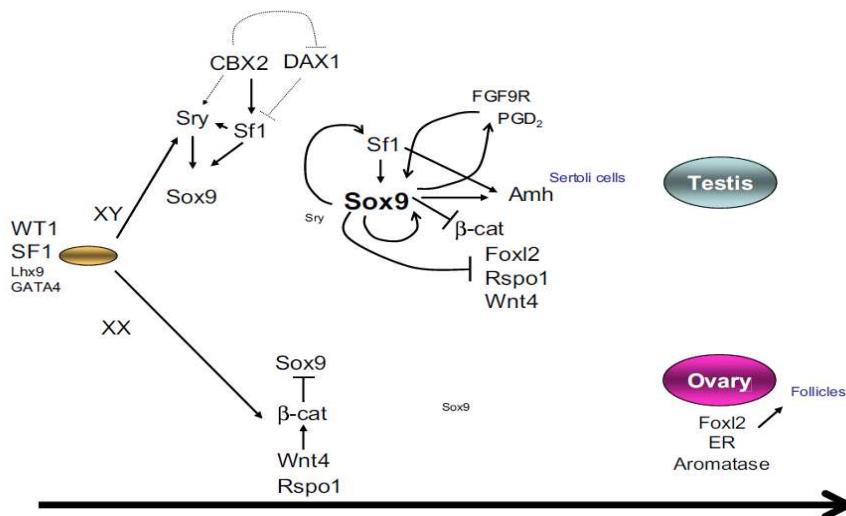


Figure 20: Chronologie simplifiée de l'interaction entre les gènes impliqués dans la différenciation sexuelle d'après Biason-Lauber A, Control of sex development, Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 24 (2010) 163–186.

5. Facteurs hormonaux

Les facteurs hormonaux, quant à eux, interviennent principalement dans la différenciation des canaux de Müller et de Wolff et du tractus urogénital. Les hormones impliquées sont secrétées essentiellement par les testicules. il s'agit de l'AMH, de la Testostérone et de son dérivé la DHT, ainsi que le récepteur aux androgènes.

La fonction endocrine de l'ovaire est certainement moins essentielle au développement du phénotype féminin, qui apparaît surtout comme la conséquence d'une absence de sécrétion testiculaire [20].

■ Le gène de l'AMH (*hormone anti-müllerienne*) est situé sur le chromosome 19 et code pour une protéine de 140 Kd. Sa production au niveau des cellules de Sertoli est sous le contrôle de plusieurs facteurs qui se fixent sur son promoteur : SOX9, SF1.... (figure 21).

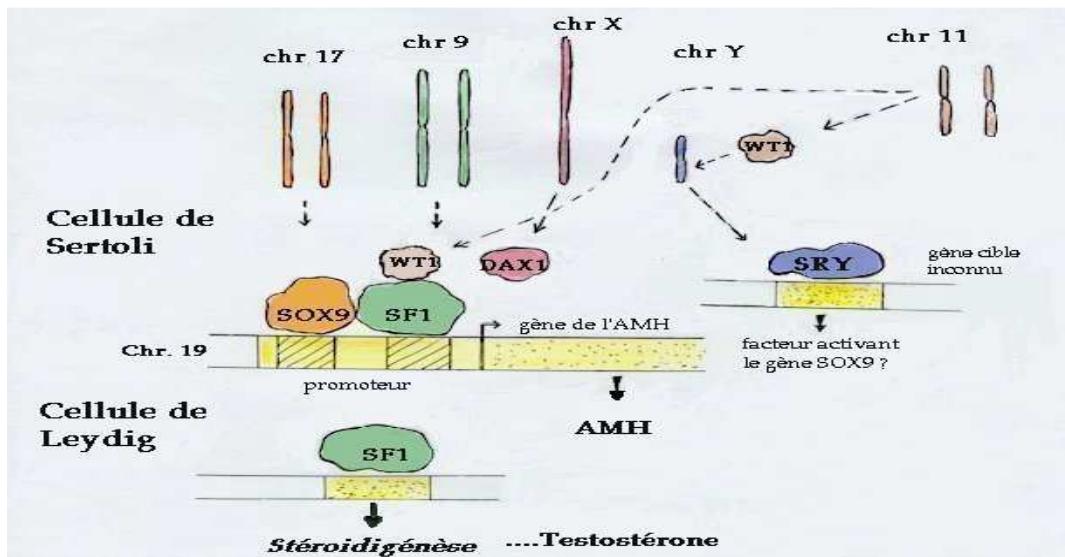


Figure 21: Schéma représentant la régulation de l'AMH

Cette hormone déclenche une réponse biologique de ses cellules cibles par l'intermédiaire de deux récepteurs transmembranaires (types I et II). Cette hormone provoque une régression rapide des canaux de Müller. Les mutations inactivatrices du gène de l'AMH ou de son récepteur de type II ont été décrites et sont responsables du syndrome de persistance des canaux de Müller. Les hommes atteints ont un phénotype masculin normal mais présentent une cryptorchidie, un utérus et des trompes [1].

■ La testostérone est une hormone synthétisée par les cellules interstitielles de Leydig du testicule foetal soit à partir de la progestérone circulante qui est formée dans le placenta, soit à partir du cholestérol, via une cascade moléculaire impliquant plusieurs enzymes (voir figure 22). La testostérone permet le développement des canaux de Wolff et des organes génitaux externes mâles. Elle traverse la membrane cellulaire de la cellule-cible sous sa forme libre pour y être réduite en dihydrotestostérone (DHT) par une enzyme spécifique, la 5 α -réductase [60]. La DHT se lie ensuite au récepteur des androgènes (AR), protéine soluble, pour activer la transcription des gènes-cibles. Un défaut de synthèse des androgènes entraîne un défaut de masculinisation du foetus. Une situation proche est représentée par le déficit en 5 alpha-réductase qui empêche la transformation de la testostérone en dihydrotestostérone nécessaire à la masculinisation des organes génitaux

externes chez le foetus. Ces enfants 46,XY ont donc un phénotype féminin à la naissance et sont élevées en tant que filles mais vont se masculiniser à la puberté quand elles deviendront directement sensibles à la testostérone [1].

■ Le gène AR du récepteur aux androgènes est porté par le chromosome X, il s'étend sur plus de 90 kb, il code pour un facteur de régulation de la transcription de 919 acides aminés appartenant à la famille des récepteurs nucléaires. Des mutations de ce gène sont responsables du syndrome d'insensibilité totale ou partielle aux androgènes entraînant soit un phénotype externe féminin normal soit des ambiguïtés sexuelles chez les individus XY [1].

■ D'autres hormones sont également impliquées, il s'agit de l'InsL3 responsable de la descente des testicules et la *Prostaglandine D2* qui agit de façon paracrine sur la différenciation des cellules de Sertoli.

III. Troubles de différenciation sexuelle, mécanisme et aspect

1. Nomenclature et classification

Après avoir illustré le déroulement du processus physiologique de la différenciation sexuelle ainsi que le système complexe qui le contrôle, on peut facilement comprendre l'étiologie et le mécanisme et donc, le phénotype, des différents troubles pouvant survenir à chacune des étapes du développement sexuel.

Dans un premier temps, toute apparence génitale ambiguë était désigné, pendant des années, par le vocable "intersex" est classée par l'équipe médicale sous l'un des termes "hermaphrodisme", "pseudohermaphrodisme masculin" ou "pseudohermaphrodisme féminin" ce qui constituait une source de malaise aux patients et à leur famille, mais en 2005, Derger et ses collègues ont proposé le remplacement du mot "intersex" par le terme "troubles de différenciation sexuelle" résumé par l'abréviation "DSD" provenant du mot anglais "disorders of sex development" [61] ce qui a été pris en considération en Novembre 2005 lors de la réunion du consensus de Chicago (LWPES-ESPE) [62, 63] qui a remplacé les anciens termes par une nouvelle terminologie constituée de l'abréviation DSD avec un préfixe basé sur le caryotype (tableau 2) résolvant ainsi la problématique de nomenclature, ce qui a connu une large acceptation par le public.

Tableau 2 : Nomenclature traditionnelle et nouvelle des troubles de différenciation sexuelle

Previous	Proposed
Intersex	Disorders of sex development (DSDs)
Male pseudohermaphrodite	46,XY DSD
Undervirilization of an XY male	
Undermasculinization of an XY male	
Female pseudohermaphrodite	46,XX DSD
Overvirilization of an XX female	
Masculinization of an XX female	
True hermaphrodite	Ovotesticular DSD
XX male or XX sex reversal	46,XX testicular DSD
XY sex reversal	46,XY complete gonadal dysgenesis

Cependant, le groupe consensus n'a pas spécifié les conditions qui définissent précisément le contenu de chaque catégorie [64], ainsi plusieurs classifications ont été proposées par la suite, notamment, celle suggérée par Hughes et coll. [65] (tableau 3), celle d'Ian A. Aaronson et coll. [64] (voire annexe 1) et celle de M. Barbaro et coll. qui répartis les troubles de différenciation sexuelle en DSD gonadique et DSD poste-gonadique [66].

Chaque classification se base sur une certaine logique, aucune d'entre elles n'est parfaite tant que la génétique moléculaire apporte continuellement du nouveau.

De mon côté, je vais adopter le model de classification suggérée par Hughes et coll. [65] (tableau 3) Qui, d'une part, prend en considération la nouvelle nomenclature, et d'autre part, classe les troubles de différenciation sexuelle selon le caryotype en classe de 46,XY DSD ou troubles de différenciation sexuelle 46,XY, classe de 46,XX DSD ou troubles de différenciation sexuelle 46,XX, alors que les troubles du sexe chromosomique regroupant les 45,X; 47,XXY et différents mosaïsmes sont classés à part.

Tableau 3: Classification des troubles de différenciation sexuelle selon Hughes

Table	An example of a DSD classification	
Sex chromosome DSD	46,XY DSD	46,XX DSD
A: 45,X (Turner Syndrome and variants)	A: Disorders of gonadal (testicular) development 1. Complete gonadal dysgenesis (Swyer syndrome) 2. Partial gonadal dysgenesis 3. Gonadal regression 4. Ovotesticular DSD B: Disorders in androgen synthesis or action 1. Androgen biosynthesis defect (e.g. 17-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency, 5 α reductase deficiency, StAR mutations) 2. Defect in androgen action (e.g. CAIS, PAIS) 3. LH receptor defects (e.g. Leydig cell hypoplasia, aplasia) 4. Disorders of AMH and AMH receptor (Persistent Mullerian Duct Syndrome)	A: Disorders of gonadal (ovarian) development 1. Ovotesticular DSD 2. Testicular DSD (e.g. SRY+, dup SOX9) 3. Gonadal dysgenesis B: Androgen excess 1. Fetal (e.g. 21 hydroxylase deficiency, 11 hydroxylase deficiency) 2. Fetoplacental (aromatase deficiency, POR) 3. Maternal (luteoma, exogenous, etc.)
C: 45,X/46,XY (mixed gonadal dysgenesis, ovotesticular DSD)	C: Other (e.g. severe hypospadias, cloacal extrophy)	C: Other (e.g. cloacal extrophy, vaginal atresia, MURCS, other syndromes)
D: 46,XX/46,XY (chimeric, ovotesticular DSD)		

2. Troubles de différenciation chromosomique

Ce volet regroupe les différentes anomalies gonomiques, à savoir, la monosomie, les mosaïsmes...

a) 47,XXY - syndrome de Klinefelter

En 1942, Klinefelter décrivit pour la première fois le syndrome qui porte aujourd'hui son nom [67]. Alors qu'en 1959, Jacob et Strong rattachaient la symptomatologie clinique du syndrome de Klinefelter à la présence d'un chromosome X supplémentaire réalisant la formule caryotypique 47,XXY.

Le *syndrome de Klinefelter* touche environ 1 homme sur 600, il est lié à la présence d'un chromosome X supplémentaire chez des sujets masculin. L'anomalie peut résulter d'une non-disjonction méiotique aussi bien maternelle (53 %) que paternelle (47 %) [68]. Ainsi, la fécondation d'un ovule XX par un spermatozoïde Y aussi bien que celle d'un ovule X par un spermatozoïde XY aboutit à la constitution d'un zygote 47,XXY. Plus rarement, ce caryotype est la conséquence d'une anomalie de mitose au cours des premières divisions du zygote, aboutissant à deux types de cellules filles: XXY et Y. Cette dernière n'étant pas viable, seule persiste la lignée XXY. Le caractère plus ou moins tardif de la survenue de cette anomalie explique l'origine des mosaïques 46, XY/47, XXY puisque seule une partie de la population cellulaire est concernée par la polygonosomie [69].

Dans ce syndrome, le retentissement phénotypique est discret (la taille et le poids sont dans les limites de la normale), une gynécomastie est notée chez environ 30 % des sujets. Les organes génitaux à la naissance sont normaux. Par contre, à la puberté, les testicules restent de petite taille. Cette atrophie testiculaire est accompagné par une azoospermie, plus rarement une oligospermie souvent sévère. Le diagnostic est donc souvent porté lors d'une consultation de stérilité [68].

Endocrinologiquement, on observe une baisse inconstante du taux de testostérone plasmatique. Le taux plasmatique des gonadotrophines, notamment, la FSH est considérablement augmenté et signe l'insuffisance gonadique au niveau de la lignée germinale [20].

Le traitement doit être envisagé aussi précocement que possible entre 11 et 13 ans lorsque le taux des gonadotrophines commence à s'élever. L'androgénothérapie substitutive doit être mise en œuvre dès l'amorce pubertaire, d'autres thérapies peuvent être envisagées selon la demande, à savoir, la mastectomie chirurgicale en cas de gynécomastie gênante, traitement androgénique de soutien en cas d'impuissance sexuelle [69,20].

b) 45,XX - syndrome de Turner

La description du syndrome de Turner (ST) a été faite en 1938 par Henry Turner, mais, ce n'est qu'en 1957 que C.-E. Ford a découvert la monosomie de l'X. Par la suite, d'autres anomalies ont été décrites (délétion, isochromosome, chromosome dicentrique et mosaïques de l'X) et le tableau clinique s'est diversifié [70].

Le syndrome de Turner est une maladie génétique rare qui atteint un sur 2500 nouveau-nés féminin. 50 % des cas ont une monosomie 45,X, les autres formes étant constituées essentiellement par des mosaïques (45,X/46,XX, etc.) et plus rarement par d'autres anomalies de structure du chromosome X [71]. L'absence partielle ou totale du deuxième chromosome X, et donc, l'haplo-insuffisance des gènes "femelle-spécifiques" situés sur l'X fait que les cellules germinales disparaissent, les follicules s'atréssent, les gonades deviennent de simples bandelettes fibreuses sans ovocytes ni follicules, et endocrinologiquement inertes (« gonade dysgénésique ») [72]. Par contre, la cœlioscopie permet de vérifier la présence d'un utérus et de trompes, hypoplasiques en l'absence de stimulation estrogénique. Les principales caractéristiques du syndrome de Turner associent une petite taille, un cou palmé, une insuffisance ovarienne et d'autres atteintes d'organes comme le cœur, le rein, la peau et le système immunitaire. Cette insuffisance ovarienne s'exprime plus ou moins tôt selon le stock résiduel de follicules ovariens. Elle se traduit dans trois quarts des cas par un impubérisme du fait de l'absence complète de folliculogénèse ovarienne. Un début de développement pubertaire spontané sera observé plus fréquent dans le cas de mosaïques que dans les monosomies (40 % versus 9 %) [73, 74]. Seulement 10 % des filles auront des menstruations, les grossesses spontanées, quant à elles, représentent 2 à 5 % [75]. Pour l'insuffisance ovarienne, le traitement

par estrogènes est indispensable, le but étant d'induire le développement des caractères sexuels secondaires, prévenir l'osteoporose et les maladies cardiovasculaires [70].

La présence de matériel Y chez les filles Turner expose au risque du développement d'un **gonadoblastome**. Il s'agit d'une tumeur bénigne à potentiel malin dont la pathogénie est obscure. La région critique du développement du gonadoblastome (GBY) est proche du centromère de l'Y et peut être détectée par biologie moléculaire. Son incidence, initialement surévaluée, a fait l'objet d'une étude en 2000 par une équipe danoise. En effet, chez 114 femmes Turner, Gravolt et al. ont noté 12 % de matériel Y, alors que cet Y n'était pas décelé sur le caryotype standard chez la moitié d'entre elles. Chez les patientes porteuses de matériel Y, l'incidence du gonadoblastome est de 7-10% [76]. Les recommandations actuelles préconisent l'indication de la gonadectomie précoce chez ces patients positifs et une surveillance gonadique par échographie biannuelle en cas de refus [77].

c) 45,X/46,XY - dysgénésie gonadique mixte (MGD)

La dysgénésie gonadique 45,X/46,XY dites mixtes ou asymétriques est une anomalie gonosomique résultant de mosaïsme du chromosome Y conduisant au développement anormale des gonades. La prévalence est inconnue. Les manifestations cliniques sont très variables, allant de virilisation partielle des organes génitaux ambigus à la naissance, jusqu'à des patients avec un phénotype complètement mâle ou femelle. Ceci dépend de la proportion des cellules monosomiques par rapport aux cellules 46,XY, mais la caractéristique la plus commune des MGD est un développement asymétrique des testicules, souvent avec un testicule dysgénésique d'un côté et une rayure de gonades de l'autre. L'asymétrie des organes génitaux externes et internes peuvent également être présentes.

A la naissance, une prise en charge multidisciplinaire est recommandée dans les cas d'organes génitaux ambigus, afin de prendre la bonne décision en ce qui concerne l'attribution du sexe et la planification des procédures, notamment, la reconstruction chirurgicale de l'état des organes génitaux selon le sexe choisi. D'autre côté, la gonadectomie peut être favorisée chez les patients avec un phénotype féminin en raison du risque accru de gonadoblastome [78].

d) 46,XX/46,XY - chimérisme

C'est la forme la plus rare des troubles de différenciation sexuelle chez les humains, caractérisée par le développement à la fois des tissus ovariens et testiculaires. En fait, ces individus disposent simultanément d'une lignée de cellules 46,XX et une deuxième lignée 46,XY, ces deux populations sont génétiquement distinctes et sont originaires de zygotes différents. Ce phénomène de chimérisme peut se produire in vitro ou naturellement pendant la grossesse, lorsque deux zygotes non-identiques combinent, à un stade très précoce de leur développement, pour former un seul fœtus [79].

D'autres formes sont aussi impliquées dans les troubles de différenciation sexuelle d'origine chromosomique, à savoir, 47,XXX, 47,XYY et autres..., ainsi que divers anomalies de structure (délétion, translocation, isochromosome....).

3. Troubles de différenciation sexuelle 46,XY – 46,XY DSD

Ce volet regroupe les individus génotypiquement masculin 46,XY ayant des troubles au niveau du développement, de la détermination ou de la fonction endocrinienne des gonades.

a) Troubles du développement gonadique (testiculaire)

Ces troubles surviennent lors de la morphogénèse ou de la détermination des gonades, ils comprennent les dysgénésies gonadiques complètes (pures) ou partielles, ainsi que les troubles ovotesticulaires.

i. Dysgénésie gonadique

Elle est dite complète ou partielle selon que la gonade est réduite à une simple bandelette de stroma fibreux indifférencié, vide de cellules germinales et dépourvue d'activité endocrinienne, ou bien qu'il persiste quelques îlots de tissu testiculaire [20].

La **dysgénésie gonadique complète**, ou syndrome de Swyer, a été décrite pour la première fois par Swyer en 1955 et était identifié comme une nouvelle forme DSD dont les principaux traits communs sont la présence chez l'individu XY d'un utérus et vagin avec des gonades réduites à des bandelettes fibreuses qui ne秘ètent aucune hormone et par conséquent, n'engendrent aucune virilisation des organes génitaux qui seront, féminins à la naissance sans ambiguïté [80].

Les patients affectés se présentent à l'âge adulte pour aménorrhée primaire associée à l'absence pubertaire [80]. L'examen biologique chez ces individus montre des niveaux de gonadotrophine élevés et une absence complète de l'AMH, de l'inhibine B et de la testostérone [10].

La dysgénésie gonadique complète résulte soit d'une aberration chromosomique soit d'une mutation des gènes qui contrôle le processus de développement gonadiques, en effet, 15% des patients souffrant de ce syndrome présentent des mutations ou délétions au niveau du gène SRY [81].

Des mutations au niveau de SF1 [45], WT1 [82], CBX2 [32] et MAMLD1 [83], et des duplications au niveau du locus DSS (où figure le gène DAX1)[84] et de WNT4[32] entraînent également des dysgénésies gonadiques comme il a été montré dans le chapitre des facteurs génétiques.

Le traitement consiste d'une part, à induire la puberté par administration d'œstrogène, et d'autre part à effectuer une gonadectomie pour éliminer le risque de tumeurs malignes [80].

La **dysgénésie gonadique partielle** se présente sous divers degrés de défaut de virilisation des organes génitaux [10]. Il s'agit de cas où la gonade est dysgénésique mais la

détermination vers la voie testiculaire a relativement eu lieu, ainsi, le tissu testiculaire peut y être identifié, et par conséquent, ces patients vont avoir des organes génitaux ambigüs et un mélange de structures Wolffiennes et Müllerienes intra-abdominales dus à une insuffisance des hormones secrétées. Il faut impérativement enlever les gonades qui présentent, dans ce cas, un risque potentiel de malignité [80].

ii. DSD ovotesticulaires

C'est le cas où les tissus ovariens et testiculaires sont tous les deux présents chez l'individu, soit qu'ils coexistent dans les deux gonades ou que chaque tissu colonise une gonade différente, dans tous les cas le phénotype dépend du degré de présence des hormones testiculaires résultant des proportions des deux tissus [85, 86].

iii. Régression testiculaire

La régression testiculaire est un cas rare où les gonades ne sont pas détectés soit par non formation, ou par régression ultérieur ainsi selon le moment de cette régression le phénotype va se diversifié allant d'un phénotype complètement féminin à une ambiguïté sexuelles jusqu'au phénotype masculin avec absence de testicules [87].

b) Troubles de synthèse ou d'action des androgènes

Ces troubles surviennent au cours de la différenciation du sexe phénotypique, lorsqu'il y a un déficit au niveau de la synthèse ou de la fonction des androgènes et de leur récepteur, notamment en présence d'anomalie de biosynthèse des hormones telles que la testostérone, la DHT, l'AMH ou en cas d'insensibilité du récepteur aux androgènes.

i. Anomalies de la biosynthèse de la testostérone

La synthèse de testostérone passe par une cascade moléculaire impliquant plusieurs enzymes clés (Figure 22).

Les blocs enzymatiques peuvent siéger à plusieurs niveaux de cette cascade entraînant des anomalies aussi bien surrénales que testiculaires, et dont les formes complètes peuvent être mortelles en raison des déficits en minéralocorticoïdes et/ou glucocorticoïdes.

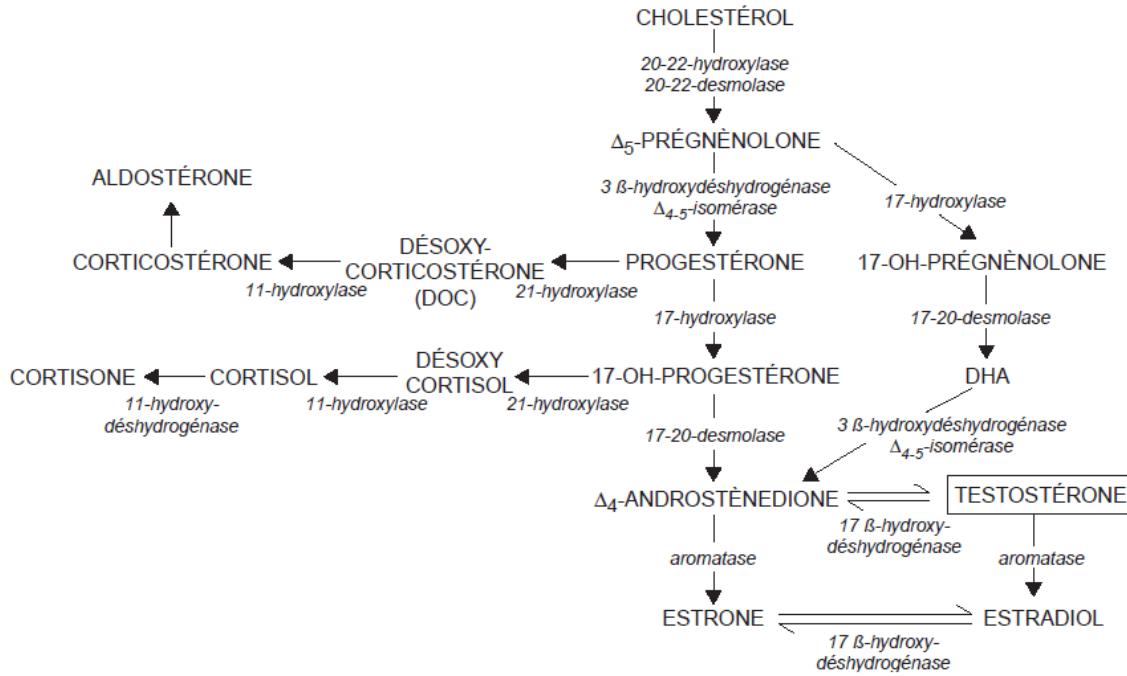


Figure 22 : Cascade moléculaire de biosynthèse des androgènes

Ces blocs, bien que rares, sont nombreux mais les plus évoqués dans la littérature sont:

■ Le déficit par mutation du facteur StAR qui est responsable du transfère du cholestérol dans la mitochondrie. Ce qui entraîne l'absence totale des hormones stéroïdes, et donc, le développement d'un phénotype féminin et une perte de sel sévère avec acidose hypérmétabolique et déshydratation létale en l'absence de traitement [88]. Ce déficit cause l'hyperplasie lipoïde congénitale des surrénales par accumulation d'esters de cholestérol dans le cytoplasme et la destruction retardée des cellules [89].

■ Le déficit rare en 3 β -hydroxystéroïde deshydrogénase / Δ4- Δ5-isomérase [90] qui bloque la biosynthèse surrénalienne et testiculaire d'une part, entre la Δ 5-prégnénolone et la progestérone, et d'autre part, entre la DHA et l'androstènedione. Le déficit porte essentiellement sur les glucocorticoïdes surrénaux, et la testostérone gonadique. Lorsqu'il est complet, ce bloc entraîne un syndrome de perte de sel à la naissance encore fréquemment mortel avec une virilisation légère des organes génitaux externes chez les femelles [91]. la forme incomplète ou encore le traitement substitutif surrénalien, permet parfois la survie. L'élévation des rapports des taux plasmatiques de 17OH-prégnénolone/progestérone et de DHA/ Δ4-androstènedione est typique de ce bloc enzymatique [20].

■ Déficit en 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD): [92, 93] Parmi les nombreuses isoformes de la 17 β -hydroxystéroïde deshydrogénase, l'isoforme de type III dont le gène est situé sur le chromosome 9q22 est spécifique des gonades [94]. C'est elle qui, en cas de mutation, entraîne un déficit de la biosynthèse de la testostérone, responsable chez le sujet XY d'un défaut de virilisation. Le déficit ici est uniquement testiculaire, empêchant la transformation d'androstènedione en testostérone tandis que la

fonction surrénalienne est normale. Ce déficit ne met donc pas en jeu le pronostic vital. Cette forme est caractérisée par un morphotype féminin à la naissance, puis l'apparition d'une virilisation à la puberté [20].

Plusieurs hypothèses [95, 96, 97] ont été proposées pour expliquer, d'une part, le caractère féminin des organes génitaux externes avec développement masculin des organes génitaux internes à la naissance, et d'autre part, la virilisation nette survenant à la puberté. Notamment, que les organes génitaux internes, qui sont plus proches du testicule, pourraient bénéficier par contiguïté du peu de testostérone qui y est produite pendant la vie embryonnaire, et qu'à la puberté, la transformation de la Δ4-androstènedione en testostérone par les autres isoformes 17 β -HSD qui s'expriment dans le foie et les tissus périphériques permettrait l'apparition d'une virilisation, d'autant plus marquée que le déficit est seulement partiel [20].

■ Le déficit de l'enzyme p450scc, autrefois nommée « 20-22 desmolase ») [98] et de La 17 α -hydroxylase [99] sont aussi responsables de défaut de testostérone.

ii. Anomalies de production de la DHT

La 5 α -réductase de type II est l'enzyme clé pour la conversion de la testostérone en DHT, hormone responsable de la masculinisation normale du sinus urogénital et des organes génitaux externes. Une carence de la DHT aboutit à un manque ou une absence totale de virilisation des OGE. Par contre, les dérivés Wolffien sont normaux, parce que les concentrations élevées de la testostérone locales sont suffisantes [10]. 50% des carences sont dues à des mutations hétérozygotes au sein des familles consanguines.

iii. Anomalies de l'action des androgènes

Le récepteur des androgènes est nécessaire pour l'action et de la testostérone et de la DHT. Toutefois, la DHT possède une affinité environ 10 fois plus élevée, ce récepteur est nécessaire au développement normal des organes génitaux externes masculins. (Figure 23)

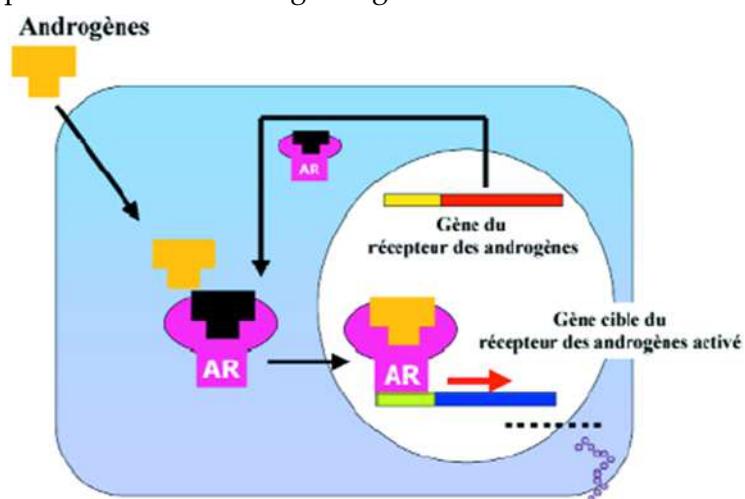


Figure 23: Mécanisme de l'action des androgènes

L'insensibilité aux androgènes est l'une des formes les plus fréquentes des DSD avec une incidence estimée de l'ordre de 1 / 60 000. 20% des cas sont familiaux avec un mode de transmission récessif lié à l'X, la cause principale de ce syndrome est la mutation du gène AR [88]. Selon le phénotype on peut distinguer deux formes:

L'insensibilité complète aux androgènes (CAIS) qui est le plus souvent, diagnostiquée à la puberté en raison de l'aménorrhée primaire avec développement normal des seins. Un certain nombre de patients sont diagnostiqués pendant l'enfance lors de chirurgie pour une hernie inguinale (uni-ou bilatérale). Plus de 80% des personnes ayant des signes cliniques de la CAIS ont une mutation détectable dans le gène AR [66]. Les individus souffrant de CAIS développent des gonades masculines normales et secrètent de l'AMH, ce qui entraîne la régression de leurs structures müllarienne avec l'existence d'un vagin court, et ont un phénotype féminin par absence de masculinisation des organes génitaux externes suite à l'insensibilité complète aux androgènes.

L'insensibilité partielle aux androgènes (PAIS) qui se présente sous divers degrés de virilisation des organes génitaux externes (masculinisation imparfaite) suite à une réponse partielle du AR [1]. Un grand nombre de mutations a été rapporté et la relation génotype/phénotype est faible pour un grand nombre d'entre eux. Dans une grande proportion de patients présentant des signes cliniques de la PAIS, il n'y a pas de mutation détectable dans la région codante du gène de l'AR [100]. Il est possible que la co-régulation du récepteur des androgènes puisse être touchée dans de tels cas, comme il est montré dans un sujet avec CAIS [101].

iv. Anomalies de l'AMH et de son récepteur

L'anomalie de la production de l'AMH ainsi que l'insensibilité à l'AMH en raison du défaut du récepteur entraîne le syndrome de persistance des canaux de Müller (PMDS). Les patients sont tout à fait normaux (virilisés), ce qui indique le fonctionnement normal des cellules de Leydig. L'AMH, à l'examen biologique, est indétectable [102], mais l'inhibine B et les androgènes sont dans la norme [103]. Le dosage de l'AMH, bien que peu utilisé dans les laboratoires hospitaliers, il s'est avérée utile dans le diagnostic non seulement de PMDS mais aussi de la plupart des DSD [10].

v. Anomalies du récepteur de LH

Un défaut au niveau du récepteur de la LH entraîne une incapacité à activer les cellules de Leydig par la stimulation hCG. Il en résulte des 46, XY DSD à divers degrés, allant de l'hypospadias léger jusqu'au phénotype génital externe complètement féminin [104].

4. Troubles de différenciation sexuelle 46,XX – 46,XX DSD

Ce volet regroupe les individus à sexe génétique 46,XX présentant des troubles au niveau du sexe gonadique ou phénotypique, ces troubles sont dus soit à des anomalies de développement ovarien ou bien à un excès d'androgène aboutissant à une virilisation anormale des OG.

a) Troubles du développement gonadique (ovarien)

Ces troubles surviennent au cours de la morphogénèse ou de la détermination des gonades, on distingue principalement la dysgénésie gonadique 46,XX, les troubles de type testiculaire ainsi que ceux de type ovotesticulaires.

i. Dysgénésie gonadique [79].

La dysgénésie gonadique 46, XX est une anomalie ovarienne aboutissant, chez des femmes 46,XX, à une insuffisance ovarienne précoce POF (anomalie caractérisée par une aménorrhée primaire ou une déplétion prématûrée des follicules ovariens avant l'âge de 40 ans entraînant une "ménopause" précoce), ce trouble résulte soit de l'échec du développement des gonades par certaines mutations ou à une résistance à la stimulation des gonadotrophine. La prévalence est inconnue mais on pense qu'elle est inférieure à 1 / 10, 000. A la naissance, le phénotype est féminin sans ambiguïté. Toutefois, les personnes atteintes se présentent à l'âge adulte suite à un retard ou absence de puberté avec aménorrhée primaire ou parfois secondaire.

Bien que l'étiologie est peu claire, plusieurs gènes s'avèrent impliqués, notamment, les mutations inactivant le gène du récepteur de l'hormone folliculo-stimulante (FSHR; 2p21-p16) qui est transmis selon un mode autosomique récessif, des mutations dans le gène BMP15 (Xp11.2) qui est lié à l'X et des mutations dans le gène NR5A1 (SF1) (9q33) qui est transmis de manière autosomique dominante dans la grande majorité des cas. La thérapie comprend un traitement hormonal substitutif.

ii. Troubles de différenciation de type testiculaire – testicular DSD

Les individus 46,XX atteints de troubles de type testiculaire (anciennement dits mâle XX) présentent généralement un phénotype masculin presque parfait avec divers degrés de féminisation : gynécomastie, faible développement de la pilosité, ainsi qu'une stérilité en rapport généralement avec des testicules hypoplasiques, scléreux avec absence de spermatogonies [20].

Les études ont montré que 90% de ces individus disposaient de fragments comprenant le gène SRY sur leur chromosome X comme conséquence d'un échange terminal entre les bras courts des chromosomes X et Y au cours de la méiose mâle, ce qui explique le phénotype masculin à la naissance, alors que les 10% des mâles XX à SRY négatives ont été expliqués par la théorie du facteur Z (évoquée précédemment dans le paragraphe du gène SRY), mais également par l'existence d'autres gènes impliqués [105, 66].

Effectivement, un mâle XX avec une duplication SOX9 a été rapporté par Huang et all. [106], Parma et all. Ont montré que la mutation du gène RSPO1 mène au développement de sexe masculin chez les sujets XX en l'absence de SRY avec des symptômes cutanés et autres manifestations [107]. R-spondines étant un ligands qui activent la voie de signalisation de la β -caténine qui favorise le développement de l'ovaire et bloque le développement des testicules.

iii. Troubles ovotesticulaires – ovotesticular DSD

Il s'agit de présence simultanée de tissu ovarien et testiculaire chez l'individu 46,XX. Les patients sont souvent nés avec des organes génitaux externes ambigus, mais le mécanisme reste inconnu. Pour expliquer ce phénomène, il a été suggéré que certaines lignées de cellules peuvent disposer d'un fragment contenant SRY qui a été transloqué à l'un des X, mais la présence de SRY n'a pas toujours été démontré dans les cellules testiculaires des cas étudiés [108].

b) Troubles de synthèse des androgènes

Dans ce cas, la morphogénèse et la détermination des gonades est normale mais les androgènes responsables de la différenciation du tractus génital sont, cette fois-ci, en excès entraînant la virilisation des organes génitaux externes. La cause peut être d'origine fœtale, fœtoplacentaire ou encore maternelle.

i. L'excès d'androgènes d'origine fœtale

Il s'agit de l'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS) qui résulte d'un bloc enzymatique sur la voie de biosynthèse du cortisol (voir figure 22), c'est la cause la plus fréquente des Troubles 46,XX de synthèse des androgènes (75 % des cas). Elle entraîne une virilisation du fœtus féminin à divers degrés classés selon Prader en 5 stades de virilisation (voir annexe 2).

Cette virilisation est provoquée précisément par la surproduction d'androgènes en amont du bloc enzymatique. Les blocs enzymatiques les plus fréquemment évoqués sont:

Bloc en 21-hydroxylase

C'est le cas le plus fréquent (90 à 95 %) et concerne 1 naissance sur 14 000. Il se révèle en période néonatale par une ambiguïté des organes génitaux externes, accompagnée inconstamment d'une perte de sel avec hyponatrémie sévère par déficit en aldostérone. La 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) plasmatoire très élevée confirme le diagnostic. Les autres androgènes surrénaux, $\Delta 4$ -androstènedione ($\Delta 4$) et sulfate de déhydroépiandrosterone (SDHA), sont élevés. Le cortisol est normal ou bas et l'ACTH (*adrenocorticotrophic hormone*) est élevée [109].

Le gène CYP21B codant pour cette enzyme est situé sur le bras court du chromosome 6. La majorité des anomalies connues du gène sont des délétions [110]. Le diagnostic prénatal est pratiqué dans les grossesses à risque et le traitement prénatal par la dexaméthasone semble efficace sur la réduction des anomalies génitales des filles atteintes [109].

Bloc en 11-hydroxylase

Il représente 5 % des hyperplasies congénitales des surrénales. Sa présentation clinique est la même que celle du bloc en 21-hydroxylase. La perte de sel est en général peu sévère. Le diagnostic biologique montre l'élévation de la désoxcorticostérone (DOC), responsable d'une hypertension artérielle à la puberté. La Δ4 et le SDHA sont élevés. Le cortisol est normal ou bas et l'ACTH est élevée.

Des mutations ponctuelles et délétions du gène codant pour l'enzyme, situé sur le chromosome 8, ont été caractérisées [111].

Bloc en 3 β -hydroxystéroïde-deshydrogénase

Ce type de bloc est rare. La virilisation est en général modérée et il existe une perte de sel. Biologiquement, la 17-OHP est souvent un peu élevée, probablement sous l'effet de la 3 β -hydroxystéroïde-deshydrogénase hépatique.

Le gène codant pour l'enzyme est situé sur le chromosome 1 et des mutations ponctuelles ont été décrites [112].

ii. L'excès d'androgènes d'origine fœtoplacentaire

Il s'agit principalement de déficit au niveau de l'aromatase placentaire qui assure la conversion de testostérone en estradiol et de la Δ4-androstènedione en estrone [113].

Pendant la gestation, de grandes quantités de SDHA sont sécrétées par la glande surrénale foetale, puis converties par les enzymes placentaires (sulfatase, 3b-hydroxystéroïde déshydrogénase, 17bhydroxystéroïde déshydrogénase..) en Δ4-androstènedione et testostérone. En l'absence d'activité aromatase placentaire, ces androgènes ne peuvent être convertis en estrogènes, et entraînent la virilisation de foetus féminin et même de la mère.

Pendant l'enfance, les ovaires sont normaux, mais à la puberté, sous l'action de FSH et l'impossibilité ovarienne de sécréter des estrogènes, de multiples kystes folliculaires se développent, les caractères sexuels féminins ne se développent pas, et une virilisation progressive s'installe. Les taux plasmatiques de testostérone, Δ4- androstènedione et des gonadotrophines sont hauts, tandis que les taux d'estradiol et estrone sont bas ou non mesurables.

Plusieurs mutations, généralement ponctuelles ont été décrites [114, 115, 116].

Le diagnostic de déficit en aromatase peut être suspecté devant une ambiguïté sexuelle XX, quand une HCS due à un bloc enzymatique a été exclue.

Un diagnostic prénatal est possible [117], notamment devant une virilisation de la mère pendant la grossesse associée à des taux maternels hauts de testostérone, Δ4-androstènedione et des taux bas d'estriol plasmatique et urinaire [20].

 Une autre situation où le déficit d'un cofacteur entraîne la carence en hormones stéroïdogènes, il s'agit du déficit en P450 oxydoréductase (POR) [66].

iii. L'excès d'androgènes d'origine maternel

L'excès d'androgènes maternel peut être endogène, lors de tumeurs virilisantes (ovariennes ou surrénauliennes), ou exogène lors d'administration au cours de la grossesse et à une période critique de la différenciation sexuelle de drogues potentiellement virilisantes. Cet excès entraîne la masculinisation du fœtus [109] pourtant, de tels cas sont peu observés dans la littérature car la fertilité est rarement normale chez les femmes présentant une hypersécrétion d'androgènes [20].

IV. Diagnostic des troubles de différenciation sexuelles

Les anomalies de la différenciation sexuelle sont souvent découvertes en période néonatale, lors de l'examen systématique des organes génitaux du nouveau-né [118].

Des progrès considérables ont été réalisés grâce à la compréhension de la base génétique du processus de la différenciation sexuelle [119], mais un diagnostic moléculaire spécifique n'est identifié que dans environ 20% des cas de DSD. En effet, La majorité de nourrissons 46,XX virilisés, ont une HCS. En revanche, seulement 50% des enfants 46,XY avec DSD recevront un diagnostic définitif [120, 121].

Ainsi, pour obtenir un diagnostic définitif chez un patient souffrant de troubles de différenciation sexuelle, une analyse rigoureuse et progressive des constatations cliniques, biologique, radiologique et génétiques doit être établit soigneusement [122].

D'abord, un entretien préliminaire avec le couple est nécessaire pour analyser le dossier en fournissant les explications utiles et compléter l'interrogatoire.

Un arbre généalogique sera établi avec la famille à la recherche d'une affection potentiellement héréditaire, il déterminera les sujets atteints et leur répartition au fil des générations, afin de pouvoir connaître le mode de transmission [123].

Ensuite, une description clinique comprenant une évaluation des structures externes de l'appareil génital ainsi que des malformations associées sera effectuée [122].

Par la suite, il y aura recours aux laboratoires pour l'examen paraclinique, radiologique et génétique.

- **L'examen paraclinique** contient principalement:

- L'ionogramme sanguin et urinaire dans la recherche de natrémie, kaliémie ou de glycémie.
- L'exploration hormonale, à savoir, le dosage de la testostérone, de la DHT, de l'AMH et des gonadotrophines plasmatiques, réalisation du test à l'HCG.

- **L'examen radiologique** contient principalement:

- L'échographie pelvienne dans le but de repérer des gonades non palpables ou visualiser un éventuel utérus.
- La génitographie ou utéro-génitographie dans le but d'étudier la cavité vaginale et rechercher l'empreinte du col utérin.
- D'autres examens sont également envisagés tels qu'une endoscopie ou cœlioscopie [124].

- **L'examen génétique** contient principalement:
 - La cytogénétique constitutionnelle qui met en évidence le nombre et la structure des chromosomes en mitose par technique de marquage en bandes, bien que la résolution de cette technique est peu satisfaisante (quelques mégabases), elle permet de diagnostiquer les troubles de différenciation du sexe chromosomique (aneuploïdies, polyploïdies, quelques anomalies structurales...).
 - La cytogénétique moléculaire qui met en évidence la présence et l'emplacement des gènes au niveau de chromosomes en mitose par le biais de sondes marquées. La résolution étant des quelques centaines de pb.
 - La biologie moléculaire qui permet une étude précise du gène recherché et de détecter toute mutation ou délétion éventuelle avec une résolution de 1 pb.

Ces différents examens sont pratiquement complémentaires et offre un large éventail d'information permettant une meilleure prise en charge et un conseil génétique adéquat.

V. Prise en charge

Comme ce fut souligné par la conférence de consensus de 2005, le soin optimal pour les enfants avec DSD requiert une équipe multidisciplinaire expérimentée, qui comprenne des disciplines et sous-spécialités diverses, notamment, gynécologie, génétique, endocrinologie pédiatrique, urologie pédiatrique, chirurgie et radiologie en plus de l'assistance psychosociale [65].

Toutefois, la composition de l'équipe variera selon la catégorie de DSD, l'âge du patient et les ressources locales. Les aspects majeurs liés au type de la prise en charge des enfants avec DSD incluent l'assignation et la réassignation du sexe, la chirurgie génitale, la gonadectomie et le traitement par des hormones sexuelles [125].

Assignation et réassignation du sexe [125]

Avoir un nouveau-né de sexe indéterminé est un grand stress pour la plupart des parents. Procéder rapidement aux tests médicaux nécessaires pour une évaluation complète et une prise de décision quant au sexe d'assignation est primordiale.

L'assignation du sexe doit prendre en considération plusieurs facteurs médicaux, notamment, le statut génital, les options de chirurgie génitale, la substitution d'hormones sexuelles tout au long de la vie, la fertilité potentielle et la capacité du fonctionnement sexuel.

Le conseil à ce stade devrait obligatoirement impliquer les deux parents car finalement c'est à eux de prendre la décision, mais ils sont susceptibles de s'appuyer sur un avis médical expert.

Quelquefois, le diagnostic des DSD n'est pas fait dès le départ, en particulier quand les enfants sont nés en dehors de structures médicales ayant l'expérience des DSD, ainsi, le diagnostic ultérieur peut changer de pronostic et rendre la réassignation désirable.

Les décisions de réassiguation du sexe après la petite enfance, qui sont plutôt rares, ne devraient jamais reposer sur des considérations purement médicales, mais elles requièrent une évaluation psychologique soigneuse du développement comportemental de l'enfant.

1. Chirurgie génitale [125]

Certains enfants à DSD requièrent une intervention chirurgicale pour des raisons médicales urgentes. Cependant, dans la plupart des cas, la chirurgie génitale a été faite pour des raisons psychosociales afin de confirmer le sexe assigné par l'apparence génitale et ainsi de faciliter l'éducation appropriée au sexe et d'éviter un stigmate social. Dans beaucoup de cas, la chirurgie génitale est aussi nécessaire pour faciliter ultérieurement le côté sexuel.

En préparant les parents et, plus tard, les patients aux décisions de chirurgie génitale, une aide doit leur être fournie pour traiter et évaluer l'information complexe sur les avantages et les désavantages de la chirurgie adulte.

2. Gonadectomie [65]

Les patients à DSD qui présentent un risque de développer des tumeurs malignes dans l'avenir sont sujets à une gonadectomie, le risque le plus élevé de tumeurs se trouve chez les patients à dysgénésie gonadique avec TSBY (protéines mâle-spécifiques codé par l'Y) positive ainsi que les individus à PAIS avec des gonades intra-abdominal, alors que le risque le plus faible (<5%) est dans le cas d'ovotestis [126] et le cas de CAIS [127, 128]. L'annexe 3 résume les recommandations concernant la gonadectomie selon le diagnostic.

3. Traitement par des hormonothérapie [125]

Pendant la petite enfance, des androgènes sont parfois utilisés pour les patients 46,XY souffrant d'un défaut de virilisation pour tester une déficience des récepteurs aux androgènes ou pour augmenter la taille du pénis si la décision d'assignation a été en faveur d'un mâle.

Les enfants à DSD qui n'ont pas de gonades ou ont des gonades hypofonctionnelles auront besoin d'hormones sexuelles substitutives pour induire ou soutenir la maturation pubertaire.

VI. Conseil génétique^[123]

Le conseil génétique est une consultation spécialisée de médecine préventive qui, à partir du diagnostic précis d'une affection génétique survenue dans une famille, tache à évaluer le risque de récidive dans cette même famille. Il s'adresse à des couples ayant eu un enfant atteint ou s'avérant inquiets sur un éventuel risque pour leur descendance parce qu'ils sont eux-mêmes atteints, ont des apparentés atteints ou appartiennent à des populations à risque.

Dans ce cas, une enquête familiale doit être minutieusement établie et aboutir à un arbre généalogique le plus complet possible. Le conseil génétique sera donc évoqué dans deux grandes situations:

- la présence d'antécédents familiaux ayant une affection au diagnostic connu et confirmé.
- des antécédents familiaux ayant une maladie potentiellement héréditaire au diagnostic non certain.

Le conseil génétique doit expliquer, avec une formulation adaptée à l'interlocuteur, le mode de transmission et le type d'analyse effectuée ainsi que ses résultats et leurs conséquences, afin de lui permettre de bien comprendre la situation dans le but de prendre les décisions qui lui conviennent le mieux.

Le conseil génétique doit également, lorsque le risque est faible ou ne diffère pas de celui de la population générale, rassurer les personnes ayant des craintes génétiquement non justifiées.

MATERIELS & METHODES

I- Série d'étude

La série d'étude comprend 17 patients qui se sont présentés à l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique pour différentes indications. Les tableaux 4 et 5 regroupent les données concernant ces patients.

Tableau 4 : Série des patients adressés au laboratoire pour trouble de différenciation sexuelle

N°	Prénom	Sexe d'élevage	Age	Région	Indication initiale
P1	Khadija	Féminin	12 ans	Taza	Retard staturopondéral (RSP)
P2	Aya	Féminin	1 an	Fès	Retard psychomoteur (RPM) et dysmorphie
P3	Sara	Féminin	18 ans	Fès	Retard pubertaire
P4	Chadia	Féminin	1 an	Taounat	Ambiguité sexuelle
P5	Rachida	Féminin	28 ans	Taza	Aménorrhée primaire
P6	Ilham	Féminin	25 ans	Fès	Ambiguité sexuelle
P7	Imane	Féminin	30 ans	Fès	Hypogonadisme hypogonadotrope (HH)
P8	Mohamed	Masculin	43 ans	Fès	Azoospermie
P9	Anas	Masculin	14 mois	Nador	Ambiguité sexuelle
P10	Zakaria	Masculin	2 mois	Taza	Ambiguité sexuelle
P11	Brahim	Masculin	2 ans	Sefrou	Ambiguité sexuelle
P12	Mohamed	Masculin	36 ans	Fès	Azoospermie
P13	Ouadie	Masculin	27 ans	My yekoub	Azoospermie
P14	Youssef	Masculin	27 ans	Fès	Ambiguité sexuelle
P15	Abdelhak	Masculin	46 ans	Fès	Hypogonadisme
P16	Abdelali	Masculin	32ans	Fès	Azoospermie
P17	Khalil	Masculin	15 ans	Fès	Gynecomastie

Tableau 5: Données cliniques, biologiques et radiologiques des patients.

N°	Constatations cliniques	Constatations biologiques	Constatations radiologiques	Trouble suspecté
P1	RSP, absence de caractères sexuels II, aménorrhée I, visage triangulaire, écartement mamelonnaire, DPM normal, cheveux bas implantés	Bilan biologique normale	-	TURNER
P2	RPM (du à souffrance néonatale), RS, dysmorphie (morphotype anormal), souffle cardiaque,	Bilan biologique normale	-	Anomalie chromosomique
P3	Spanioménorrhé , caractère sexuel II peu développé		Uterus ovarie hypotrophiques	DSD*
P4	Bourrelets hypertrophiés, bourgeon génital de 1 cm, hypospadias, gonades palpables, Peau hyperpigmenté type scrotale, présence de 2 orifices	-	-	DSD
P5	Aménorrhée primaire, caractères sexuelles secondaires +/- masculin	-	-	DSD
P6	Retard pubertaire, absence de signe de virilisation, petit seins, OGE d'aspect féminin	FSH basse, 17 B oestradiol basse	Absence d'individualisation de l'utérus et de l'ovaire	DSD

N°	Constatations cliniques	Constatations biologiques	Constatations radiologiques	Trouble suspecté
P7	Aménorrhée II	FSH et LH élevé	Uterus faible de taille, ovaire non visualisé, pas de masse pelvienne	DSD
P8	Hypospadias, plusieurs orifices uretraux, testicule droit de petit taille en place, absence de testicule gauche	Azoospermie	-	DSD
P9	Bourgeon génital, bourrelet génitaux lisse, absence de testicule	17OHP élevée, delta4 élevée, testostérone élevée	Présence de masse pelvienne en faveur d'utérus	HCS**
P10	Retard statural, vomissement chronique et diarrhée, ambiguïté sexuelle	Testostérone normal dans la limite supérieur, FSH et LH faible, progestérone élevée	Masse pelvienne rappelant utérus	HCS
P11	Absence de testicules palpables, ambiguïté sexuelle	17OHP élevée, delta4 élevée, testostérone élevée	Structure rappelant l'utérus, gonades non visualisé	HCS
P12	Phénotype normal, testicules de petite taille	Azoospermie, fsh élevé, lh élevé, testosterone limite inférieur	-	Syndrome de klinefelter
P13	Petits testicules	Azoospermie, fsh élevé, lh normal	Petits testicules homogènes	Syndrome de klinefelter
P14	Micropenis, pas de pilosité thoracique, petits testicules, pilosité pubienne de type féminins	Fsh élevé, testostérone normal	-	Syndrome de klinefelter
P15	Distribution génoïde des graisses, absence de pilosité	Fsh normal, lh normal, testostérone faible	-	Syndrome de klinefelter
P16	Petit testicules, gynécomastie	Azoospermie, testostérone et prolactine normal	-	Syndrome de klinefelter
P17	Gynécomastie, présence de caractères sexuelsiliaires masculins	LH et FSH élevée, TSH, T3 et T4 normale, testostérone basse, prolactine élevée	Age osseux < age chronologique, testicules de tailles réduite en intra scrotal, gynécomastie homogène bilatérale	Syndrome de klinefelter

*Disorder of sex development(trouble de différenciation sexuel), **Hyperplasie congénitale des surrénales

II- Prélèvement sanguin & Conservation

Pour chaque patient, on a effectué un prélèvement de sang veineux (de 3 à 5 ml) qui a été stockés dans deux tubes:

- Tube Hépariné (Lithium Heparin) consacré pour l'étude cytogénétique. Ce tube est conservé à +4°C et ne doit pas dépasser trois jours de stockage pour obtenir une culture optimale.
- Tube EDTA (Ethylène Diamine Tétra-acétique acide) consacré pour la DNAthèque

III- Caryotype par marquage aux bandes R

1. Principe

Le caryotype est le processus d'appariement et de mise en ordre des chromosomes d'un individu, qui sert à détecter les anomalies chromosomiques que se soient de nombres ou de structures.

Les lymphocytes sanguins sont mis en culture stimulés par la phytohémagglutinine (PHA), puis bloqués en métaphase par colchicine qui perturbe les fuseaux mitotiques.

Par la suite, les chromosomes seront dispersés par un choque hypotonique, puis fixés par un fixateur à base d'alcool et d'acétate.

Ces chromosomes seront sujets à une technique de marquage par bandes : permettant de mettre en évidence 400 à 500 bandes constantes et caractéristiques d'une paire chromosomique donnée.

Plusieurs marquages sont utilisés notamment celui des bandes R obtenues après dénaturation thermique ménagée des chromosomes puis coloration par Giemsa.

Enfin un logiciel va permettre de classer les différents chromosomes ainsi obtenu sous un ordre de taille décroissant.

2. Réactifs nécessaires (annexe 4)

Les réactifs utilisés dans le protocole du caryotype sont:

- ✚ Milieu de culture contenant principalement:
 - ◆ Sérum
 - ◆ Mitogène (PHA)
 - ◆ Antibiotique
- ✚ Colchicine CaryoMax 10 mg/ml
- ✚ KCL 0.065 M (1.4g de KCl qsp 300 ml)
- ✚ Carnoy I (3 V méthanol-1 V acide acétique)
- ✚ Earl
- ✚ Giemsa 7% qui est un colorant.

3. Protocole expérimental

a) Mise en culture des cellules sanguines

On prélève à partir du sang préalablement conservé dans le tube hépariné, 500 µl qu'on ajoute, sous hôte, à un tube de 15 ml contenant un milieu de culture prêt à l'emploi (PB-MAX Karyotyping middle d'Invitrogen). On note sur ce tube les données du patient (nom,

numéro du dossier, date de culture). Le tube est ensuite incubé en position inclinée à 37°C pendant 72 h.

b) Blocage des cellules en métaphase

Après 72 h de culture, on y ajoute sous hôte 100 µl de colchicine qui a pour rôle de bloquer les cellules en métaphase. Après avoir bien mélangé les constituants on remet le tube à l'étuve à 37°C pendant 50 minutes.

c) Choc hypotonique

On prépare d'abord la solution hypotonique de KCl 0.065 M qui sert à éclater les cellules. Cette solution doit être à 37°C lors d'utilisation.

Après 50 minutes, on mélange le tube, on centrifuge à 1500 tr/mn à 25°C pendant 5 mn et on élimine le surnageant pour ne garder que le culot. On suspend ce dernier dans quelques gouttes de la solution de KCl 0.065 M à l'aide d'une pipette, puis on complète à 12 ml par la même solution. On homogénéise bien et on incube à 37°C pendant 20 mn.

d) Fixation

Le fixateur ou solution de Carnoy I doit être préparé juste avant l'utilisation. Il est constitué de trois volumes de méthanol additionnés d'un volume d'acide acétique.

Après incubation, on effectue une série de fixations précédée par une préfixation:

- ◆ Préfixation:

On ajoute 1ml du fixateur au tube, soit 13 ml au total. On centrifuge à 1500 tr/mn à 25°C pendant 5 mn et on élimine le surnageant.

- ◆ Première fixation:

On suspend le culot dans quelques gouttes de Carnoy I et on complète à 10 ml par la même solution. On homogénéise et on incube pendant 20 mn à température ambiante. Puis on centrifuge à 1500 tr/mn à 25°C pendant 5 mn, on retire le surnageant jusqu'à environ 0.5 ml.

- ◆ Deuxième fixation:

On remet le culot en suspension dans quelques gouttes du fixateur et on complète à 8 ml. On homogénéise et on laisse fixer à température ambiante pendant au moins 45mn. Ensuite, on centrifuge à 1500 tr/mn à 25°C pendant 5 mn et on retire le surnageant jusqu'à environ 1ml. Ensuite on procède à l'étalement.

e) Etalement

D'abord on prépare une pièce sous conditions de température de 22°C ± 2 et d'humidité d'au moins 45% ± 5. On prépare également des lames à bord rodé sur lequel on note les références du patient.

On remet le culot contenant les leucocytes en suspension dans quelques gouttes du Carnoy I, on aspire dans l'effilure de la pipette pasteur. Dans la zone humidifiée, on tient la pipette pasteur horizontalement au dessus de la lame avec une distance d'à peu près 25 cm, et on laisse tomber 2 à 3 gouttes de la culture d'une façon à couvrir l'ensemble de la lame. Puis on laisse sécher à température ambiante.

Une fois séchées, on incube les lames à 37°C pendant 4 jours pour permettre la déshydratation des chromosomes et pour rendre fragile les liaisons hydrogènes qui lient les deux brins d'ADN, à fin de les préparer pour l'étape de dénaturation.

f) Dénaturation et coloration

Au quatrième jour d'incubation on récupère les lames et on procède à la dénaturation thermique ménagée qui vise les liaisons A=T. On met les lames dans la solution saline Earl à 87°C pendant 1 h 25 mn, ensuite on rince les lames et on les met dans une solution de Giemsa 7% (colorant) pendant 8 mn à fin de colorer les chromosomes en bandes claires et sombres. En effet les liaisons A = T dénaturées dans l'étape précédente ne peuvent plus absorber le colorant et apparaissent claires sous microscope, alors que les liaisons G ≡ C qui sont restées intactes absorbent le colorant et apparaissent sombres sous microscope.

On laisse sécher la lame pour la lire sous un microscope relié à un ordinateur qui va permettre à l'aide du logiciel "Applied Imaging CytoVision™ 3.6" d'organiser les chromosomes sous la forme du caryotype classique.

IV- Hybridation *in situ* fluorescente (FISH) via la sonde LSI SRY/CEPX

1. Principe

La FISH consiste à faire hybrider une sonde marquée (par fluorochrome) avec sa séquence spécifique (locus spécifique, partie télomérique ou centromérique, ou encore un chromosome entier) supposée présente au niveau d'une préparation chromosomique grâce à la complémentarité de bases, et ceci selon des conditions de température, de salinité et de pH bien précises. La fluorescence est ensuite visualisée sous microscope à épifluorescence.

2. Réactifs nécessaires (annexe 4)

- Solution de 1 X PBS
- Solution 2 X SSC
- Solution 2 X SSC / 0,1% NP40
- Solution 0,4 X SSC / 0,3% NP40
- Pepsine 0.4 mg/ml
- Ethanol 100%, 85% et 70%

- Sonde "SRY Probe LSI SRY Spectrum Orange_CEPX Spectrum Green (\approx 120 Kb)
- DAPI
- Eau distillée

3. Protocole expérimental

La FISH suit dans ses premières étapes le protocole du caryotype jusqu'à obtention des lames étalées et sèches. Sur ces lames on délimite la zone riche en mitoses qui sera ciblée par les étapes qui suivent.

Avant de débuter la technique, on met au bain marie les solutions qui seront utilisées à chaud.

a) Prétraitement

On immerge les lames, en premier lieu, dans la solution de 2XSSC (solution de lavage) à 37°C pendant 30mn, ensuite dans du PBS 1 X (solution de lavage) à température ambiante pendant 1 minute.

b) Traitement à la pepsine

On place les lames sur le ThermoBrite (un système permettant d'automatiser les étapes de dénaturation et d'hybridation pour les protocoles de la FISH), à 37°C, on recouvre la zone délimité par la pepsine diluée (pour éliminer les impuretés) et on laisse incuber entre 10 et 20 mn. Ensuite on immerge les lames dans du PBS 1 X pendant 2 mn, puis on déshydrate la lame dans un gradient d'éthanol 70%, 85% et 100%, 2 mn chacun. On laisse sécher les lames avant de procéder à l'étape d'Hybridation.

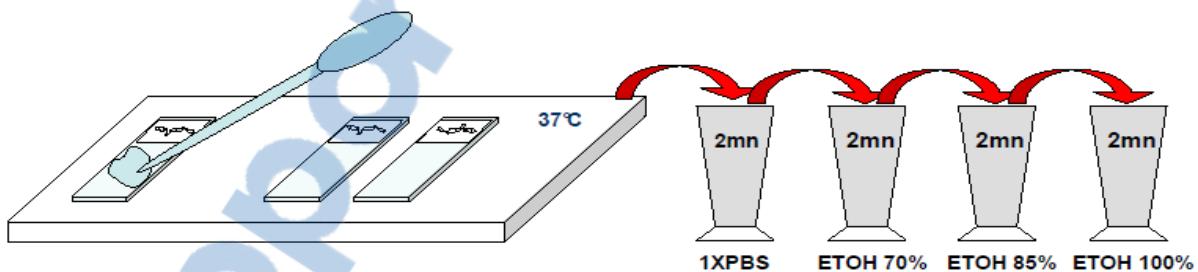


Figure 24: Traitement à la pepsine et lavages

c) Hybridation des échantillons

On prépare d'abord la sonde qui sera utilisée dans cette étape: on met dans un tube de 0.2 ml, dans l'ordre suivant, 7 μ l de tampon d'hybridation, 2 μ l d'H₂O et 1 μ l de sonde. On vortexe et on centrifuge pour faire descendre les gouttes de la paroi. Puis on dépose les 10 μ l de la sonde préparée sur une lamelle.

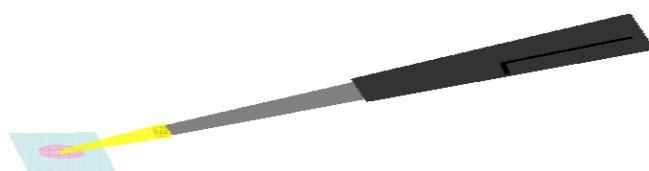


Figure 25: Dépôt de la sonde

On reprend, ensuite, la lame échantillon et on la retourne sur la lamelle exactement au niveau de la zone délimitée. On retourne immédiatement la lame et on scelle la lamelle à l'aide de Rubber Cement à fin de créer une sorte de "chambre" où va se dérouler la réaction d'hybridation.



Figure 26: Création de la chambre d'hybridation

On place la lame dans le ThermoBrite et on laisse incuber à 37°C pendant 5 mn avant de lancer le programme de dénaturation/hybridation:

Température de dénaturation : 73°C / temps de dénaturation: 1 mn
Température d'hybridation : 37°C / temps d'hybridation : 20 h

d) Lavage Post-Hybridation

A partir de cette étape on travaille en lumière réduite de manière à préserver les fluorochromes des sondes présentes sur les lames.

A la fin de l'hybridation, on récupère les lames du ThermoBrite, on retire le Rubber Cement et on place la lame (avec la lamelle dessus) dans la solution de lavage 2 X SSC / 0,1% NP40 à t° ambiante pendant quelques secondes pour faciliter le décollement de la lamelle. On retire ensuite délicatement la lamelle et on transfère la lame dans la solution 0,4 X SSC / 0,3% NP40 à 73°C pendant 2 mn. On effectue un rinçage à température ambiante 30 s à 1mn, puis, on laisse sécher la lame à l'obscurité.

e) Contre-Coloration des noyaux au DAPI

On dépose 10 µl de DAPI sur une lamelle, puis on retourne la lame échantillon sur la lamelle (de la même façon que pour la sonde d'hybridation).

On place les lames à 4°C pendant au moins 5mn avant de procéder à la lecture sous microscope.

V- Extraction d'ADN par sel sur suspension cellulaire

1. Principe

L'extraction d'ADN sur suspension cellulaire est une technique qui permet d'isoler l'ADN à partir d'une suspension cellulaire par lyse des cellules suivie d'une élimination des protéines et tout débris cellulaire, puis une précipitation de l'ADN par l'alcool.

2. Réactifs nécessaires (voir annexe 4)

- Tris-EDTA 20 mM / 5 mM
- Tris-EDTA 10 mM /1 mM
- SLB à +42°C
- Protéase K 10 mg/ml
- Na Cl 5 M
- Ethanol 75% à +4°C
- Eau Distillée stérile

3. Protocole expérimental

On utilise pour l'extraction d'ADN, le sang conservé dans le tube EDTA qui a été stocké à -20°C. Donc on le laisse décongeler juste avant la manipulation.

a) Lyse des globules rouges

On récupère le sang dans un tube de 15 ml, on ajoute deux volumes du tampon d'extraction TE 20/5 qui va lyser les globules rouges, puis, on incube dans la glace pendant 20 mn.

Après incubation, on centrifuge à 2500 tr/mn pendant 5 mn, on élimine le surnageant jusqu'à 1ml.

On refait les étapes précédents (ajout de deux volumes de TE 20/5, incubation.....) jusqu'à obtenir un culot blanc ne renfermant que les globules blancs.

b) Lyse des globules blancs

On suspend le culot dans 3 ml de SLB, on homogénéise, puis on ajoute 100 µl de protéinase K. Ensuite on incube 42°C pendant une nuit sous agitation douce.

c) Dénaturation et précipitation des protéines et impuretés

Le lendemain, on ajoute 4 ml d'eau distillée stérile et 4 ml de NaCl 5 M, on homogénéise bien, puis on centrifuge à 3000 tr/mn pendant 30 mn.

d) Précipitation et lavage de l'ADN

On récupère le surnageant dans un nouveau tube de 50 ml, on ajoute deux volumes d'éthanol absolu froid et on homogénéise pour faire apparaître "la méduse" d'ADN.

On récupère la méduse dans un tube eppendorff de 1.5 ml, on réalise un lavage à l'éthanol 75% et on laisse évaporer les traces de l'éthanol.

Après évaporation, on dilue l'ADN dans 200 µl de TE et on le stocke à +4°C pour toute utilisation ultérieure (pour un stockage prolongé il est préférable de conserver l'ADN à -20°C).

VI- Extraction d'ADN par Kit sur suspension cellulaire

1. Principe

L'extraction d'ADN par Kit sur suspension cellulaire est une technique qui permet d'isoler l'ADN à partir d'une suspension cellulaire grâce à un kit muni de billes magnétiques qui après lyse cellulaire va permettre de collecter l'ADN dispersé dans la solution sur une plaque magnétique permettant ainsi de le purifier avec un rendement maximal. Ce qui rend cette technique avantageuse lorsqu'il y a un faible volume de sang.

2. Réactifs nécessaires

- Kit GeneCatcherTM DNA (3-10 ml de Sang) contenant les solutions suivantes:
 - ◆ GeneCatcherTM tampon Lysis (L13)
 - ◆ Protéase
 - ◆ Tampon Protéase
 - ◆ GeneCatcherTM billes Magnétiques
 - ◆ GeneCatcherTM tampon de lavage (W12)
 - ◆ GeneCatcherTM tampon Elution (E5)
- Isopropanol absolu
- Isopropanol 50 %

3. Protocole expérimental

a) Extraction de l'ADN

Dans un premier temps on met dans un tube de 50 ml le volume adéquat du tampon de Lysis (L13) et des billes magnétiques resuspendues préalablement selon le tableau suivant:

Tableau 6: Volumes de billes magnétiques et du tampon de lysis corréspondant au volume du sang

Blood (ml)	3	4	5	6	7	8	9	10
Beads (µl)	45	60	75	90	105	120	135	150
L13 (ml)	9	12	15	18	21	24	27	30

On homogénéise le mélange en tourbillonnant le tube jusqu'à ce que les billes soient dispersées, puis on y ajoute le sang conservé préalablement dans le tube EDTA après décongélation.

On incube le tube à température ambiante pendant 5 mn tout en agitant de temps en temps pour permettre à l'ADN de se lier aux billes, puis on place le tube sur le support du Séparateur Magnétique pendant 3 minutes.



Figure 27: Séparateur magnétique

Sans enlever le tube du séparateur magnétique, on élimine soigneusement le surnageant à l'aide d'une pipette de 5 ml sans toucher les billes.

On enlève le tube du séparateur magnétique, on ajoute 5 ml du tampon de Lysis (L13), on inverse doucement le tube 3 fois pour enlever les contaminations résiduelles par lavage, puis on incube à la température ambiante pendant 30 secondes.

On place le tube sur le séparateur magnétique pendant 20 secondes et sans déplacer le tube, on élimine le surnageant à l'aide d'une pipette de 5 ml sans toucher les billes.

b) Purification de l'ADN

On met le bain marie à 65°C.

On enlève le tube du Séparateur Magnétique puis on ajoute le volume de la Protéase et du tampon de Protéase selon le volume initial du sang (tableau 7).

Tableau 7: Volumes de protéase et du tampon de protéase correspondant au volume du sang

Blood (ml)	3	4	5	6	7	8	9	10
Protease Buffer (ml)	3	3	3	3	3.5	4	4.5	5
Protease (μl)	40	40	40	40	40	40	40	40

On vortexe le tube pendant 30 s pour disperser les billes, puis on incube le tube à 65°C pendant 10 minutes et ensuite à la température ambiante pendant 10 à 20 minutes.

Après incubation on inverse doucement le tube deux fois pour resuspendre les billes, on ajoute 5 ml d'isopropanol (IPA) 100 % et on tourbillonne le tube pour précipiter l'ADN. On remarque l'apparition d'une forme d'agrégation visible.

On place le tube sur le séparateur magnétique pendant 30 secondes, on élimine le surnageant et on ajoute 3 ml d' IPA 50% (v/v) après avoir enlever le tube du séparateur magnétique.

On inverse doucement le tube 5 fois, on le place sur le séparateur magnétique pendant 30 secondes, puis, sans enlever le tube du séparateur magnétique, on élimine soigneusement le surnageant à l'aide d'une pipette de 5 ml sans toucher les billes.

c) Lavage de l'ADN

Sans déplacer le tube, on ajoute doucement 250 µl du tampon de lavage (W12), on incube pendant 1 minute et on élimine le surnageant.

On répète ces étapes deux fois, puis on enlève le tube du séparateur magnétique.

d) Elution de l'ADN

On ajoute au tube 1 ml du tampon d'Elution (E5), puis on l'incube à 65°C pendant 1 h.

Après incubation, on mixe le contenu du tube par une pipette et on place le tube sur le séparateur magnétique jusqu'à clarification du surnageant.

Une fois clair, on récupère le surnageant contenant l'ADN épuré dans un tube d'eppendorff de 1.5.

De même, l'ADN sera stocké à +4°C pour toute utilisation ultérieure.

VII- Amplification du gène SRY par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Pour le gène SRY on a réalisé deux types de PCR:

- La PCR multiplexe dans laquelle on a utilisé dans le même mix deux types d'amorces, celles amplifiant l'exon du gène SRY (annexe 5) et celles amplifiant le marqueur du chromosome X, DXS1684. Cette première PCR avait pour but de détecter la présence du gène SRY tout en signalant la présence du chromosome X.
- La PCR simplexe qui a été utilisée en amont du séquençage et dans laquelle on a utilisé deux paires d'amorces qui divisaient (en chevauchant) le gène SRY en deux parties (annexe 5), mais qui étaient mises dans deux mix séparément.

Avant d'utiliser ces PCR pour tester les patients, on a réalisé tout d'abord une mise au point qui sera discutée dans la partie résultats et discussion.

1. Principe

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique qui permet, via un programme de cycles dénaturation/hybridation/élongation, d'amplifier *in vitro* une séquence spécifique d'un ADN donné grâce à une ADN polymérase thermorésistante (Taq polymérase) afin d'en tirer une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

2. Réactifs nécessaires et programme PCR

Tableau 8: PCR multiplexe SRY/DXS1684

Gène	SRY	Locus	Yp11.31	Nombre d'exons	1			
Taille de l'amplifia	Amorce Forward (5'>3')			Amorce Revers (5'>3')				
648 pb	GTCGCACTCTCCTGTGGAC			CCGATTGTCCTACAGTTGTC				
marqueur	DXS1684	locus	Xq28	Nombre d'exons	-			
Taille de l'amplifia	Amorce Forward (5'>3')			Amorce Revers (5'>3')				
128-148 pb	AGCACCCAGTAAGAGACTGAAC			CCTCAGTGGCAACCACCAAG				
Conditions expérimentales			Programme PCR					
Réactif		concentration	V (μl)	Etape	T (°C)	Temps	cycles	
Tampon		5 X	5					
MgCl ₂		25 mM	2.5	Dénaturation initiale	94 °C	7 min	1	
dNTP		10 mM	0.5					
Amorces SRY	SRY F	10 mM	2	Dénaturation	94°C	30 s	30	
	SRY R	10 mM	2					
Amorces DXS164	DXS1684 F	10 mM	2	Hybridation	68°C	30 s		
	DXS1684 R	10 mM	2					
H ₂ O		qsp	6.8	Elongation	72°C	30 s		
Taq		5 u/μl	0.2					
ADN		100 ng/μl	2	Elongation finale	72°C	7 min	1	
Volume total		25 μl						

Tableau 8': PCR multiplexe SRY/DXS1684 du premier essai de la mise au point

Conditions expérimentales			Programme PCR					
Réactif		concentration	V (μl)	Etape	T (°C)	Temp s	Cycles	
Tampon		5X	5					
MgCl ₂		25mM	2.5	Dénaturation initiale	94 °C	7min	1	
dNTP		10mM	0.5					
Amorces SRY	SRY F	10mM	2	Dénaturation	94°C	30s	35	
	SRY R	10mM	2					
Amorces DXS164	DXS1684 F	10mM	2	Hybridation	61°C	30s		
	DXS1684 R	10mM	2					
H ₂ O		qsp	7.8	Elongation	72°C	30s		
Taq		5u/μl	0.2					
ADN		500 ng/μl	1	Elongation finale	72°C	7min	1	

Tableau 9 : PCR simplexe SRY1

Gène	SRY(1 ^e partie)		locus	Yp11.31					
Taille de l'amplifia	Amorce 1Forward (5'>3')			Amorce 1Revers (5'>3')					
475 pb	TTCGAACCTCTGGCACCTTC			CAATTCTCGGCAGCATCTT					
Conditions expérimentales			Programme PCR						
Réactif	concentration	V (μl)	Etape						
Tampon	5 X	5							
MgCl2	25 mM	2.5	Dénaturation initiale		94 °C	6 min	1		
dNTP	10 mM	0.5			94°C	30 s	30		
Amorces SRY	SRY 1F	10 mM			56°C	30 s			
	SRY 1R	10 mM			72°C	30 s			
H2O	qsp	10.8	Elongation		72°C	5 min	1		
Taq	5 u/μl	0.2			94 °C	6 min	30		
ADN	100 ng/μl	2			94°C	30 s			
Volume total	25 μl		Elongation finale		72°C	30 s	30		

Tableau 10: PCR simplexe SRY2

Gène	SRY(2 ^e partie)		locus	Yp11.31					
Taille de l'amplifia	Amorce 1Forward (5'>3')			Amorce 1Revers (5'>3')					
410 pb	GCTGGGATACCACTGGAAAAA			AAAGTGAGGGCTGTAAGTTATCG					
Conditions expérimentales			Programme PCR						
Réactif	concentration	V (μl)	Etape						
Tampon	5 X	5							
MgCl2	25 mM	2.5	Dénaturation initiale		94 °C	6 min	1		
dNTP	10 mM	0.5			94°C	30 s	30		
Amorces SRY	SRY 2F	10 mM			56°C	30 s			
	SRY 2R	10 mM			72°C	30 s	30		
H2O	qsp	10.8	Elongation		72°C	30 s			
Taq	5 u/μl	0.2			94 °C	6 min	30		
ADN	100 ng/μl	2			94°C	30 s			
Volume total	25 μl		Elongation finale		72°C	5 min	1		

3. Protocole expérimental

Dans un premier temps, on prépare les tubes eppendorff de 0.2 ml selon le nombre des ADN qu'on veut amplifier. On utilise les deux contrôles positifs (l'ADN d'un homme 46,XY normal et d'une femme 46,XX normale), le contrôle négatif (ne contenant aucun ADN) et l'ADN de(s) patient(s) qu'on veut tester. On note sur chaque tube les donnés correspondants, puis on prépare le mix PCR qui contient le volume des différents constituants signalés précédemment, chacun multiplié par le nombre des ADN qu'on veut amplifier.

On aliquote le mix préparé dans les différents tubes en raison de 23 µl par tube puis on ajoute dans chaque tube 2 µl d'ADN correspondant.

On met les tubes dans le ThermoCycleur et on lance le programme de dénaturation/hybridation/ élongation illustré précédemment.

A la fin de la réaction on récupère les tubes et on les conserve à +4°C jusqu'à utilisation.

VIII- Visualisation du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

1. Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique qui permet la séparation des molécules chargées sous l'action d'un champ électrique en fonction de leur taille et de leur charge électrique. A pH neutre, les molécules d'ADN chargé négativement en raison de la présence du phosphate migrent vers l'anode. Le BET s'étant intercalé entre les bases de l'ADN va permettre de visualiser les bandes d'ADN sous UV.

2. Réactifs nécessaires (voire annexe 4)

- Poudre d'agarose
- TAE 1X
- BET
- Solution de charge

3. Protocole expérimental

Dans un premier temps, on prépare le gel d'agarose 1.5%. Pour ceci on met dans un récipient 0.75 g de poudre d'agarose et 50 ml de TAE 1X, on porte à ébullition puis on ajoute 2 µl de BET qui est un agent révélateur par sa fluorescence sous U.V et qui va s'intercaler entre les bases.

On coule le gel dans le moule à électrophorèse, on y installe un peigne qui sera retiré après refroidissement du gel en laissant à sa place des puits où sera déposé l'ADN.

Après refroidissement, on installe le moule dans la cuve qui est remplie du tampon de migration (TAE 1X), on dépose dans chaque puits un mélange de 8.5 µl de produit PCR et de 1.5 µl de solution de charge qui a pour rôle de stabiliser l'ADN au fond du puits et on lance la migration à 100 V. Finalement, on visualise les bandes d'ADN fluorescentes sous UV.

IX- Séquençage du gène SRY

Le séquençage est un procédé qui permet d'obtenir la séquence nucléotidique exacte d'un fragment d'ADN. Initialement appliquée par Fréderick Sanger, cette technique a reconnu depuis un énorme progrès consistant en l'utilisation de kits spécifiques, marquage par quatre types de fluorochromes, automatisation du processus...

Avant de procéder au séquençage proprement dit, il est nécessaire de passer par des étapes de préparation du produit à séquencer à fin d'obtenir un résultat optimal.

A. Purification du produit PCR

1. Principe

La purification du produit PCR consiste à éliminer les traces des constituants de la réaction de PCR, à savoir, les amorces, les résidus, les dNTP... et ne garder que l'ADN à séquencer pour ne pas gêner les réactions en aval.

2. Réactifs nécessaires

- Produit PCR
- L'ExoSap-IT® qui est constitué principalement de deux enzymes:
 - ◆ L'exonucléase S1 qui dégrade tous les brins monocaténaires et donc toutes les amorces.
 - ◆ La phosphatase alcaline qui va déphosphoryler tous les dNTP qui n'étaient pas incorporés dans la réaction précédente.

3. Protocole expérimental

Dans un tube eppendorff de 0.2 ml, on met 2µl de la solution ExoSap en présence de 10 µl du produit PCR.

On met le mélange réactionnel dans le ThermoCycleur et on lance le programme spécifique de l'ExoSap:

Tableau 11: Programme de l'ExoSap

Stade	Température	Temps	cycles
1	37°C	3 mn	1
2	80°C	15 mn	1
3	10°C	∞	1

B. Réaction de séquence

1. Principe

Cette technique, comme la PCR, est basée sur la copie d'un fragment d'ADN que l'on désire séquencer par une Taq polymérase. Sauf que dans cette réaction on ajoute en plus des 4 dNTP une faible quantité des 4 ddNTP (didésoxyribonucléotides) dont le groupement OH du carbone 3' du désoxyribose est remplacé par un atome d'hydrogène de façon à bloquer la réaction d'elongation chaque fois incorporé. Chaque type de ddNTP est marqué par un fluorochrome différent qui servira à la détection des bases au niveau du séquenceur.

2. Réactifs nécessaires

- Kit de la réaction de séquence ABI®BigDye® Terminator V1.1 cycle sequencing
Kits qui contient principalement:
 - ◆ Taq polymérase
 - ◆ dNTP
 - ◆ ddNTP marqués
 - ◆ tampon
 - ◆ MgCL₂
- Produit PCR purifié
- Amorces spécifiques
- Eau stérile

3. Protocole expérimental

On prépare, dans des tubes eppendorff de 0.2ml, le mixe illustré dans le tableau 12, soit 4 tubes pour chaque patient.

Tableau 12: Volumes des réactifs du mix de la réaction de séquence

Tubes de réaction	BigDye (μl)	Amorces 10mM (μl)	Pr. PCR purifié (μl)	Eau stérile (μl)	Volume finale (μl)
Tube 1 F (contenant les amorces F de la séquence SRY1)	1.5	1	3	4.5	10
Tube 1 R (contenant les amorces R de la séquence SRY1)	1.5	1	3	4.5	10
Tube 1 F (contenant les amorces F de la séquence SRY2)	1.5	1	2	5.5	10
Tube 1 R (contenant les amorces R de la séquence SRY2)	1.5	1	2	5.5	10

On met le tube dans le TermoCycleur et on démarre le programme suivant:

Tableau 13: Programme de la réaction de séquence

Stade	Température	Temps	cycles
1	96°C	1 min	1
2	96°C	10 s	25
	50°C	5s	
	60°C		
3	10°C	∞	1

A la fin de la réaction, on récupère les tubes, et on passe à la purification du produit de la réaction de séquence.

C. Purification du produit de la réaction de séquence

1. Principe

Cette purification consiste à éliminer l'excès des réactifs de la réaction de séquençage pour ne pas gêner le séquençage.

2. Réactifs nécessaires

- ✚ Kit "BigDye® XTerminator™ purification Kit" contenant:
 - ◆ SAM™Solution (tampon)
 - ◆ BigDye®XTerminator™Solution (résines)

3. Protocole expérimental

On met dans le puits de la plaque 45 µl du produit SAM™Solution et 10 µl du produit BigDye®XTerminator™Solution préalablement vortexé pour suspendre les résines et 10 µl du produit de la réaction de séquençage. On met, ensuite la plaque sous agitation légère pendant 30 min, puis on centrifuge à 1000 pendant 2 minutes et on transfère le surnageant contenant les fragments à séquencer dans les puits de la plaque du séquenceur.

D. Chargement du séquenceur

On met la plaque dans le séquenceur qui est un automate d'électrophorèse capillaire qui lance un flux électrique d'ions à travers un capillaire ce qui entraîne la migration des fragments d'ADN. Une fois arrivés au site de détection, les quatres fluorochromes des ddNTP terminaux seront excités. Suite à cette excitation, chaque fluorochrome émettra une lumière à une longueur d'onde différente qui sera détectée puis convertie en séquence par le logiciel d'analyse des séquences.

RESULTATS & DISCUSSION

Le sang des patients qui se sont présentés à l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique avec différentes indications de troubles de différenciation sexuelle a été prélevé afin d'effectuer les tests nécessaires pour le diagnostic.

Dans un premier temps on a effectué le caryotype pour tous les patients afin de déterminer leur sexe génotypique et détecter les éventuelles anomalies chromosomiques. Ensuite, selon le résultat obtenu on a décidé du test suivant (FISH, PCR, Séquençage).

I- Résultat du caryotype

Les résultats obtenus après le caryotype sont regroupés dans le tableau suivant:

Tableau 14: Résultats du caryotype

N°	Age	Indication initiale	Sexe d'élevage	Sexe génotypique
P1	12 ans	Retard staturopondéral (RSP)	Féminin	45,X
P2	1 an	Retard psychomoteur et dysmorphie	Féminin	mos45,X[5]/46,X,i(X)(q10)[6]
P3	18 ans	Retard pubertaire	Féminin	45,X[2]/46,XX[19]
P4	1 an	Ambiguité sexuelle	Féminin	46,XY
P5	28 ans	Aménorrhée primaire	Féminin	46,XY
P6	25 ans	Ambiguité sexuelle	Féminin	46,XY
P7	30 ans	Hypogonadisme hypogonadotrope	Féminin	mos45,X[11]/46,XY[8]
P8	43 ans	Azoospermie	Masculin	mos46,XY[1]/45,X[14]
P9	1 an	Ambiguité sexuelle	Masculin	46,XX
P10	2 mois	Ambiguité sexuelle	Masculin	46,XX
P11	2 ans	Ambiguité sexuelle	Masculin	46,XX
P12	36 ans	Azoospermie	Masculin	47,XXY
P13	27 ans	Azoospermie	Masculin	47,XXY
P14	27 ans	Ambiguité sexuelle	Masculin	47,XXY
P15	46 ans	Hypogonadisme	Masculin	47,XXY
P16	32ans	Azoospermie	Masculin	47,XXY
P17	15 ans	Gynecomastie	Masculin	47,XXY

N.B : on mettra ci-dessous un exemple de chaque cas, les cas restant seront illustrés en annexe 6.

Le résultat du caryotype a permis de clarifier le sexe chromosomique et les anomalies chromosomiques. On a pu classer les patients selon leur caryotype en 5 catégories:

- ▢ Syndrome de Turner
- ▢ Femme XY
- ▢ Dysgénésie gonadique mixte 45,X/46,XY
- ▢ Homme XX
- ▢ Syndrome de Klinefelter

II- Les anomalies détectées

1. Syndrome de Turner

c'est le cas des patients P1 (figure 28), P2 (figure 29)et P3.

■ Le patient P1 de sexe phénotypique (d'élevage) féminin a été adressé à l'unité de génétique pour retard statural (RSP). Le bilan biologique normal et les constatations cliniques montrant une absence des caractères sexuels secondaires, aménorrhée primaire, visage triangulaire et écartement mamelonnaire suspecte le syndrome de Turner. Ce qui a été confirmée par le caryotype qui a permis de mettre en évidence la monosomie de l'X.

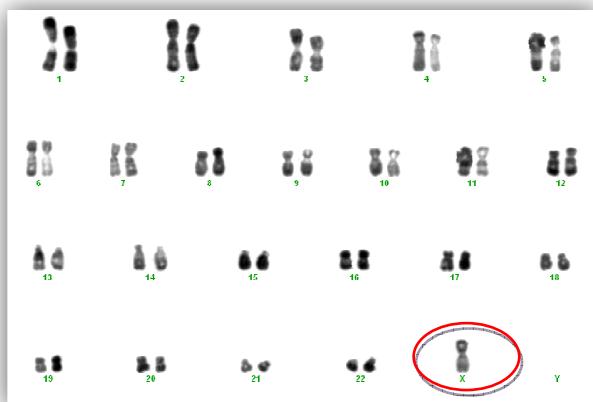


Figure 28: Caryotype du patient P1 (syndrome de Turner 45,X)

■ Le Patient P2 de sexe phénotypique (d'élevage) féminin a été adressé à l'unité de génétique pour retard statural, retard psychomoteur (RPM) et dysmorphie en présence de bilan biologique normal. les constatations cliniques et biologiques suspectaient une anomalie chromosomique. le résultat de caryotype, de son côté, a montré des mitoses avec monosomie de l'X, et d'autres avec isochromosome du bras long de l'X indiquant un syndrome de Turner en mosaïque. Pour ce cas, le caryotype a, donc, permis de spécifier de quelle anomalie il s'agit.



Figure 29: Caryotype du patient P2 syndrome de Turner en mosaïque

■ Le patient P3 de sexe phénotypique (d'élevage) féminin a été adressé à l'unité de génétique pour retard pubertaire. Les constatations cliniques montrent une spanioménorrhée et des caractères sexuels secondaires peu développés et les constatations radiologiques montrent une hypotrophie de l'utérus et de l'ovaire. Ces constatations n'ont pas pu spécifier le type de trouble de différenciation sexuelle en question. Par contre, le caryotype a mis en évidence la présence de deux populations cellulaires 45,X et 46,XX indiquant le syndrome de Turner en mosaïque.

Les caractères phénotypiques observés sont dus à une haplo-insuffisance des gènes échappant au mécanisme de l'inactivation de l'X tels que le gène SHOX impliqué dans la taille [129] et les gènes POF1 et POF2 impliqués dans le maintien de la fonction ovarienne [130]

La stratégie thérapeutique de ces trois patients consiste principalement en un traitement substitutif par des œstrogènes pour induire le développement des caractères sexuels secondaires et prévenir l'ostéoporose. Le traitement par hormone de croissance permettra de compenser le retard de croissance.

Le risque de récidive lors d'une grossesse ultérieur est faible.

Il a été évoqué dans le paragraphe de Turner que la présence du gène SRY chez les Turner expose à un risque de gonadoblastome qui nécessitera une gonadectomie préventive. L'étape suivante est, donc, de vérifier la présence du gène SRY par PCR chez ces patients.

2. Femme XY

C'est le cas des patients P4 (figure 30), P5 et P6.

■ Le patient P4 de sexe phénotypique (d'élevage) féminin a été adressé à l'unité de génétique pour ambiguïté sexuelle avec des gonades palpables; Le patient P5 pour aménorrhée primaire avec des signes cliniques de caractères sexuels secondaires plus ou moins masculins et le patient P6 pour ambiguïté sexuelle avec des signes cliniques de retard pubertaire et des OGE d'aspect féminin et des constatations radiologiques montrant une absence de l'utérus et des ovaires. Ces différents signes n'ont pas pu spécifier le type de trouble de différenciation sexuelle.

Par contre, le caryotype a permis de mettre en évidence des mitoses homogènes de type 46,XY indiquant un génotype masculin et donc un trouble de différenciation sexuelle 46,XY.

On déduit du caryotype que ces patients sont génotypiquement masculins mais qui ont subit une anomalie au cours de la différenciation sexuelle qui a engendré un phénotype féminin avec quelques signes d'ambigüité sexuelle.

En effet la littérature a déterminé les principales causes de ce type de discordances génotype-phénotype dont les plus évoquées sont:

- Dysgénésie gonadique complète (syndrome de swyer) suspectée en présence d'utérus et de gonade dysgénésique et en absence de sécrétions hormonales (qui peut se traduire cliniquement par aménorrhée primaire et absence pubertaire) et dont 15% ont une anomalie au niveau du gène SRY [81].
- Anomalie de synthèse d'androgène évoquée en présence d'un bilan biologique suspect.
- Insensibilité aux androgènes par anomalie du gène codant pour le récepteur des androgènes. Ce cas est suspecté en présence de bilan biologique normal, de gonades normales et en absence de l'utérus.

La cytogénétique s'avère incapable de déterminer les causes précises du trouble 46,XY découvert chez chaque patient de cette catégorie.



Figure 30: Caryotype du patient P4 (femme XY)

Pour comprendre mieux l'étiologie de la discordance entre le phénotype et le génotype, la PCR du gène SRY a été effectuée pour ces patients.

3. Dysgénésie gonadique mixte 45,X/46,XY

C'est le cas des patients P7 (figure 31) et P8 qui présentent des mitoses en mosaïsme renfermant deux types de population cellulaire, 45,X et 46,XY.



Figure 31: Caryotype du patient P7 (45,X/46,XY)

■ Le Patient P7 de sexe phénotypique (d'élevage) féminin a été adressé à l'unité de génétique médicale pour aménorrhée secondaire et hypogonadisme hypogonadotrope déduit des constatations biologiques montrant un taux de LH et de FSH élevé. Les constatations radiologiques ont montré l'absence d'ovaire et la présence d'utérus de taille faible. Ces constatations suspectent des troubles de différenciation sexuelle non spécifiés. Le caryotype, quant à lui, a montré la présence de mosaïsme 45,X/46,XY indiquant une dysgénésie gonadique mixte. Or, une aménorrhée secondaire ne peut survenir qu'en présence d'une fraction de cellules 46, XX intacte. Ce qui a incité à confirmer cette constatation par FISH qui dans ce cas facilitera la recherche de mitoses de type 46,XX par sonde LSI SRY/CEPX et permettra le comptage des cellules aisément .

■ Le patient P8 de sexe phénotypique (d'élevage) masculin a été adressé à l'unité de génétique médicale pour azoospermie avec des constatations cliniques montrant une ambiguïté sexuelle, ce qui suspecte des troubles de différenciation sexuelle non spécifiés.

Par contre, le caryotype a permis de mettre en évidence le mosaïsme 45,X/46,XY avec une proportion de 1 versus 14 indiquant une dysgénésie gonadique mixte. Or, le phénotype masculin de ce patient ne peut être dû à un nombre aussi minime de cellules 46,XY.

La détermination de la proportion précise et significative du mosaïsme nécessite le comptage sur une population de cellules plus large. Cette démarche sera facilitée par la FISH via la sonde LSI SRY/CEPX.

4. Homme XX

c'est le cas des patients P9 (figure 32), P10 et P11 qui présentent des mitoses homogènes de type 46,XX.

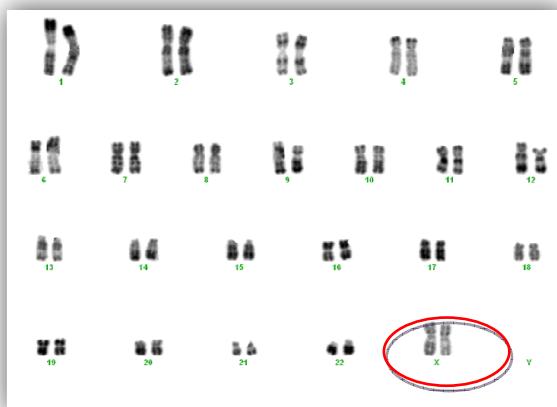


Figure 32: Caryotype du patient P9 (homme XX)

■ Les patients P9 et P11 à sexe d'élevage masculin ont à peu près les mêmes signes. Ils ont été adressés au laboratoire de génétique pour ambiguïté sexuelle. Les constatations cliniques indiquent l'absence des testicules. Les constatations radiologiques montrent une masse pelvienne en faveur de l'utérus. Alors que les constatations biologiques montrent des taux élevés de 17 OH-progestérone, de Δ4-androsténedione et de la testostérone. Ces constatations soupçonnent fortement l'hyperplasie congénitale des surrénales, ce qui a été confirmé par la mise en évidence d'un caryotype 46,XX sur toutes les mitoses.

En effet, la 17 OH-progestérone élevée indique qu'il y a un bloc au niveau de l'enzyme 21-hydroxylase (voir figure 22) ceci va entraîner une production excessive de la Δ4-androsténedione et donc de la testostérone, ce qui a été confirmé par le dosage de ces derniers.

Cet excès de testostérone a entraîné la virilisation des OGE qui se sont avérés ambiguës. Le résultat du caryotype montrant un sexe génotypique 46,XX a permis de confirmer ces hypothèses.

Dans ce cas la cytogénétique a contribué avec les bilans biologiques et cliniques dans l'établissement du diagnostic définitif. Pourtant, afin de confirmer qu'il s'agit de déficit au niveau de la 21-hydroxylase, il est préférable de doser cette enzyme ou séquencer le gène correspondant.

■ Le patient P10 à sexe d'élevage masculin a été adressé au laboratoire de génétique pour ambiguïté sexuelle. Les constatations biologiques, cliniques et radiologiques ont soupçonné une hyperplasie congénitale des surrénales. Cependant, il a été nécessaire de confirmer par le caryotype.

En effet, le bilan biologique montre un taux de progestérone élevé, ce qui indique qu'il y a un bloc enzymatique en aval et puisque la testostérone est relativement élevée ceci

montre que ce bloc concerne la 21-hydroxylase (figure 22). Les vomissements et les diarrhées indiquent un syndrome de perte de sel dû à une carence en aldostérone. Ces explications ont été confirmées par le caryotype qui montre que le sexe génotypique est de type 46,XX, et que l'ambigüité sexuelle est due à une virilisation des OGE initialement féminins par excès d'androgène.

Le traitement de cette catégorie est principalement hormonal substitutif, notamment par anti adrogènes avec glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes pour les formes classiques avec perte de sel (P10), et glucocorticoïdes pour les formes virilisantes pures (P9 et P11). Une surveillance rigoureuse (pédiatrique et à l'âge adulte) permettra d'améliorer le pronostic. Les anomalies des organes génitaux chez les filles peuvent nécessiter une intervention chirurgicale [131].

Pour les parents, un conseil génétique doit impérativement être proposé avant toute grossesse (risque de récurrence de 1/4).

Un diagnostic prénatal est ainsi proposé pour les grossesses ultérieures afin de pouvoir mettre en route le plus précocement possible (avant la formation du bourgeon génital, soit au minimum avant 7 semaines de grossesse) un traitement préventif à base de Dexamethasone poursuivi jusqu'à la naissance en cas de fœtus féminin (le diagnostic génétique étant anténatal précoce par ponction de villosités choriales) [132].

5. Syndrome de Klinefelter

C'est le cas des patients P12 (figure 33) à P17 qui présentent un caryotype 47,XXY sur toutes les mitoses testées.

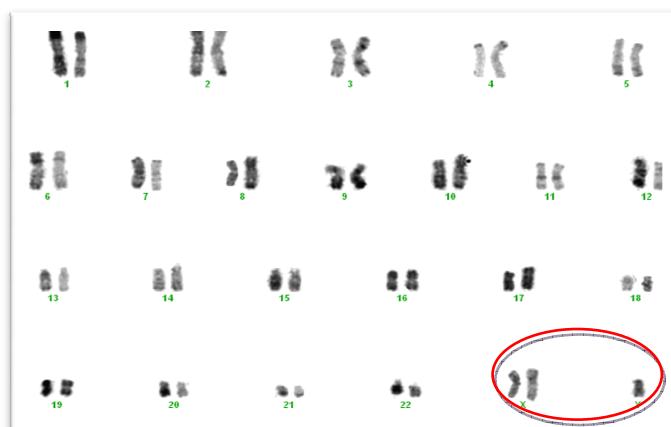


Figure 33: Caryotype du patient P12 (syndrome de klinefelter)

Les patients P12, P13 et P16 à sexe d'élevage masculin ont à peu près les mêmes signes. Ils ont été adressés au laboratoire de génétique pour azoospermie avec des signes cliniques de petits testicules et gynécomastie pour le P16. Le bilan biologique montre des taux élevés de LH et de FSH avec, pour le premier cas une testostérone à la limite inférieure.

■ Le patient P14 à sexe d'élevage masculin a consulté pour ambiguïté sexuelle avec des signes cliniques montrant des petits testicules et un bilan biologique indiquant une FSH élevée.

■ Le patient P15 à sexe d'élevage masculin a consulté pour hypogonadisme avec des signes cliniques d'absence de pilosité et de distribution gynoïde des graisses, ainsi que des signes biologiques montrant une testostérone élevée.

■ Le patient P17 à sexe d'élevage masculin a consulté pour gynécomastie. Le bilan clinique a montré un taux élevé de LH et FSH et un faible taux de testostérone.

Les différents signes biologiques et cliniques de ces patients suspectaient un syndrome de klinefelter qui est caractérisé par des testicules hypotrophiques secrétant peu de testostérone, ce qui engendre un faible développement des caractères sexuels secondaires et des gonadotrophines élevées à cause de la diminution du feedback négatif appliqué par la testostérone. La diminution de la production de testostérone entraîne également une hypotrophie des tubes séminifères qui est à l'origine des problèmes de fertilité.

Le caryotype a permis, pour cette catégorie, de préciser le diagnostic définitif et donc de prescrire le traitement nécessaire qui est dans ce cas un traitement de substitution androgénique qui doit être commencé dès la puberté. La dose d'hormones doit être augmentée avec l'âge de manière à maintenir une concentration correcte en testostérone, oestradiol, FSH et LH.

Ainsi, ce traitement contribuera au développement des caractères masculins secondaires (pilosité, voix grave, développement de la musculature) et évitera le développement des glandes mammaires et préviendra l'ostéoporose.

Une chirurgie peut être envisagée en cas de gynécomastie gênante.

III- Résultat de la FISH

La technique de la FISH a été appliquée principalement pour les patients P7 et P8 à caryotype 45,X/46,XY.

Les spots verts correspondent à la région centromérique du chromosome X (CEPX), alors que les spots oranges correspondent à la région Yp11.3.

Chez le patient P8, le résultat de la FISH a permis de mettre en évidence la présence d'un mosaïsme 45,X/46,XY. En effet, on observe sur la figure 34 une première mitose contenant un spot vert correspondant aux régions hybridées des deux chromatides du chromosome X , et un spot orange correspondant à celles du chromosome Y. alors que la figure 35 montre une deuxième mitose renfermant un seul spot vert indiquant la présence exclusive du chromosome X.

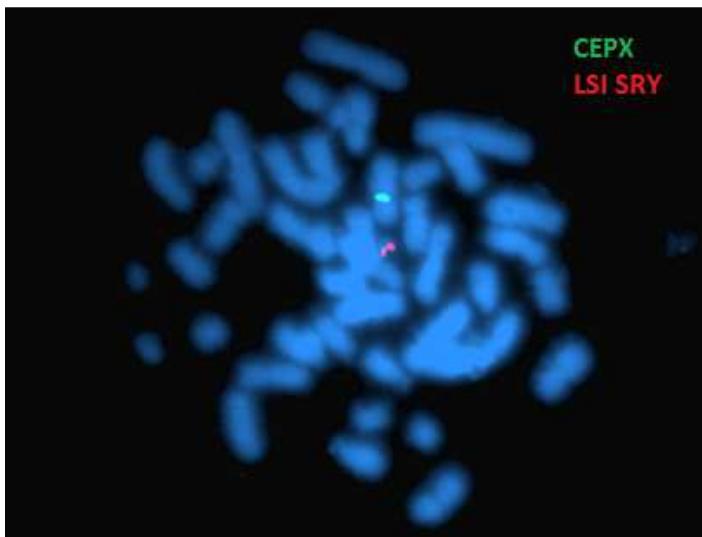


Figure 34: Résultat de FISH du P8 montrant un spot vert et un spot orange

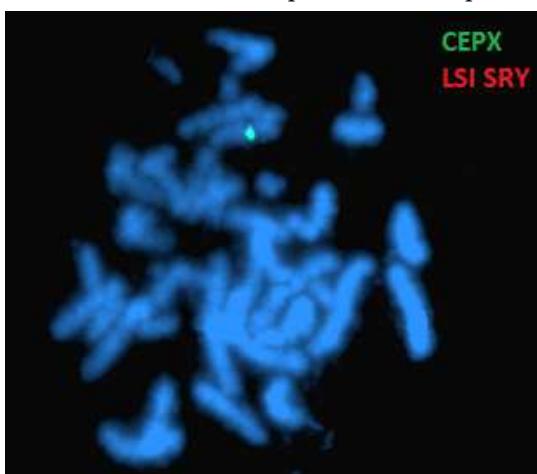


Figure 35: Résultat de FISH du P8 montrant un seul spot vert

Ainsi, le résultat de la FISH confirme celui du caryotype pour le patient P 8.

Le comptage sur lame, quant à lui, indique la présence de formule 46,XY sur 50 noyaux et mitoses et 45,X sur 18 noyaux et mitoses.

Ainsi, le diagnostic définitif pour ce patient est le syndrome de dysgénésie gonadique mixte 45,X/ 46,XY avec la formule chromosomique "mos46,XY[50]/ 45,X[18].

La littérature (voir revue bibliographique) indique que le phénotype des patients 45,X/46,XY est très diversifié, allant d'un phénotype complètement féminin à un phénotype complètement masculin passant par l'ambigüité sexuelle et ceci selon la proportion des cellules 45,X par rapport aux cellules 46,XY. Vu ceci, on peut déduire que le phénotype du P8, qui tend vers un profil masculin, pourrait être dû au fait que les cellules 46,XY sont plus importantes que celles 45,X.

Le résultat de la FISH du patient P7 a montré des noyaux 46,XY renfermant deux spot, vert et orange (figure 36) et des mitoses 45,X . Il a mis en évidence également la présence d'un autre type de mitose 46,XX qui n'a pas été détecté sur caryotype (figure 37).

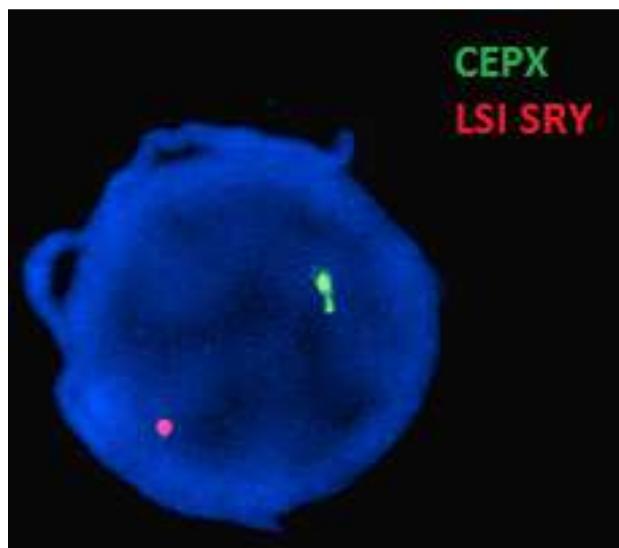


Figure 36: Résultat de FISH du P7 montrant deux spots, vert et orange

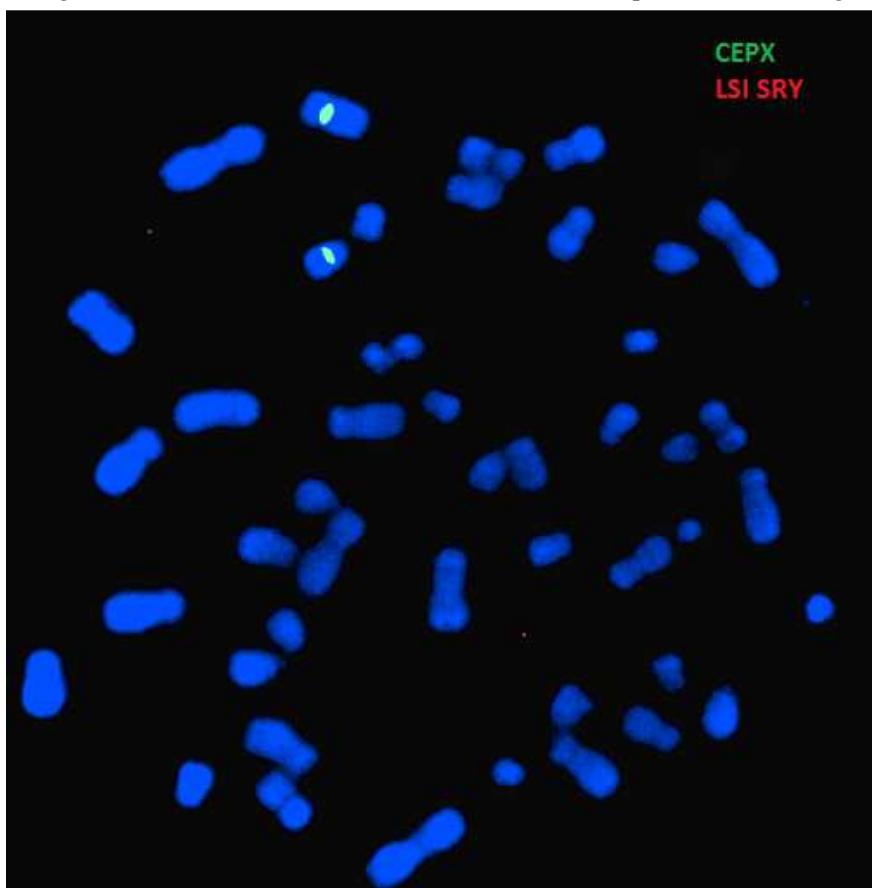


Figure 37: Résultat de FISH du P7 montrant deux spots verts

Le comptage sur lame à montré les proportions suivantes:

- 46,XX sur 64 noyaux et mitoses
- 45,X sur 41 noyaux et mitoses
- 46,XY sur 10 noyaux et mitose

Ainsi, le diagnostic définitif pour ce patient est le syndrome de dysgénésie gonadique mixte 46,XX/45,X/46,XY qu'on présente sous la formule "mos46,XX[64]/45,X[41]/46,XY[10]".

Le résultat final concorde parfaitement avec les constatations cliniques notamment celle d'aménorrhée secondaire.

Tous les cas de dysgénésie gonadique mixte sont sporadiques. Les caryotypes tels que 45, X/46, XY sont probablement causés par la perte mitotique du chromosome Y chez les fœtus initialement 46,XY. On ne sait pas, toutefois, s'il existe une prédisposition à la perte du chromosome Y chez ces sujets ou s'il s'agit simplement d'un événement aléatoire causé par l'instabilité de l'appariement chromosomique XY [133]. A partir de ces données on peut conclure que, Pour le patient P8, le nombre faible de mitoses 45,X confirme le fait qu'il s'agit de perte du chromosome Y au cours des mitoses. Ce nombre faible signifie également que cette anomalie a eu lieu à un stade plus tardif.

Plusieurs corrélations génotype-phénotype ont été établies: une expression partielle du gène SRY conduit à une dysgénésie testiculaire partielle et aboutit à une faible synthèse de testostérone entraînant un déficit de virilisation; La formation de l'utérus est due à l'absence de production de l'hormone antimüllérienne [79].

La prise en charge à la naissance permet d'améliorer la qualité de vie des patients 45,X/46,XY. Or les patients P7 et P8 ont consulté à un âge tardif (respectivement 30 ans et 46 ans), ce qui rend la prise en charge assez délicate. En effet, à la naissance on aurait pu remédier aux ambiguïtés sexuelles par assignation du sexe et chirurgie génitale favorisant l'apparence normale du sexe choisi.

Malheureusement pour l'instant, seul un suivi de l'état des gonades peut être mis en place chez ces patients afin de prévenir tout signe de malignité, le cas échéant, effectuer une gonadectomie [79].

IV- Résultat de la mise au point de la PCR multiplexe SRY/ DDXS1684

La mise au point de la PCR multiplexe SRY/DDXS1684 a été initiée en premier lieu par l'unité, donc j'ai repris les essais à partir de leur dernière expérience résumé dans le tableau 8' (page 49) et dont le résultat est illustré sur la figure 38.

Les expériences de la mise au point ont été appliquées sur deux contrôles positifs, mâle 46,XY et femelle 46,XX, et un contrôle négatif.

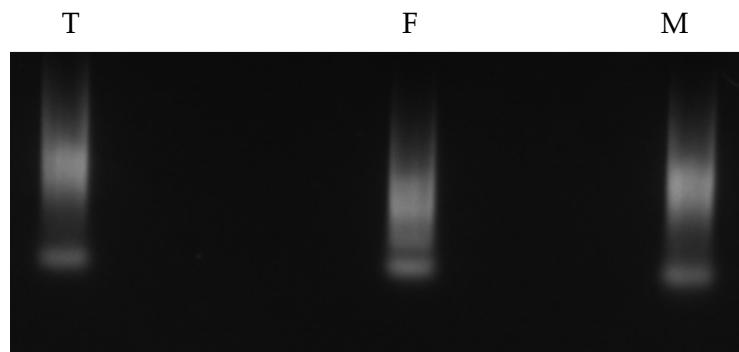


Figure 38 : Résultat du premier essai de PCR SRY/DXS1684

T: Témoin négatif; F: Femelle; M: Mâle

Le résultat du premier essai (figure 38) montre une absence totale de bandes pour les témoins positifs, male (M) et femelle (F). Ceci pourrait être expliqué par le fait que la température d'hybridation utilisée n'a pas permis l'hybridation des amorces, donc, aucune amplification n'a eu lieu.

La première étape a, donc, consisté à ajuster la température d'hybridation (initialement 61°C) qui a été basse par rapport à T_m (65,5°C). Ainsi, on a utilisé trois températures d'hybridation: 65°C, 68°C et 70°C.

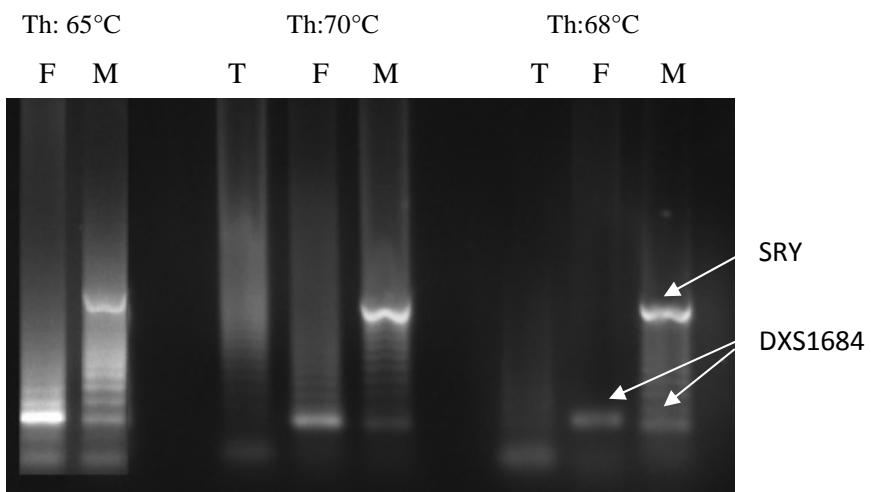


Figure 39: Résultat PCR SRY/DXS1684, gamme de températures d'hybridation
Th: Température d'hybridation; T: Témoin négatif; F: Femelle; M: Mâle

Le résultat (figure 39) montre l'apparition de bandes pour les trois températures d'hybridation avec moins de smear pour la température de 68°C.

Ce résultat montre que dans le premier essai, il s'agissait effectivement de problème de température d'hybridation, et qu'après augmentation de cette dernière on a pu visualiser des bandes, ce qui indique que dans le deuxième essai, l'hybridation et l'amplification ont eu lieu. Ce résultat montre également qu'une meilleure hybridation d'amorces est obtenue à une température d'hybridation de 68°C, car le smear y a diminué. Cette température a été retenu par la suite comme température d'hybridation optimale.

On en déduit que la température d'hybridation exacte est cruciale dans une PCR.

Le peu de smear persistant pourrait être dû à un nombre élevé de cycle. La deuxième étape était, donc, de diminuer le nombre de cycle à 30 tout en maintenant la température d'hybridation 68°C.

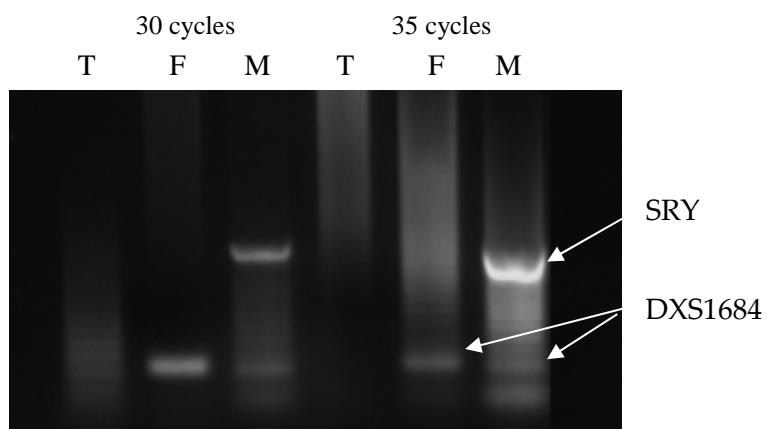


Figure 40: Résultat PCR SRY/DXS1684, gamme de cycles
T: Témoin négatif; F: Femelle; M: Mâle

Le résultat (figure 40) montre une amélioration du profil en faveur de 30 cycles. Ceci confirme l'hypothèse initiale car trop de cycles peut entraîner des amplifications non spécifiques.

Le nombre de cycles 30 est, donc, retenu dans la suite des expériences.

Malgré la diminution de l'intensité de smear en présence de 30 cycles (figure 40), on observe une trainée minime au niveau des témoins positifs. Ceci pourrait être dû à une concentration élevée d'ADN dans le milieu réactionnel.

Pour vérifier cette hypothèse, la troisième étape a consisté en l'ajustement de la concentration et du volume de l'ADN utilisé.

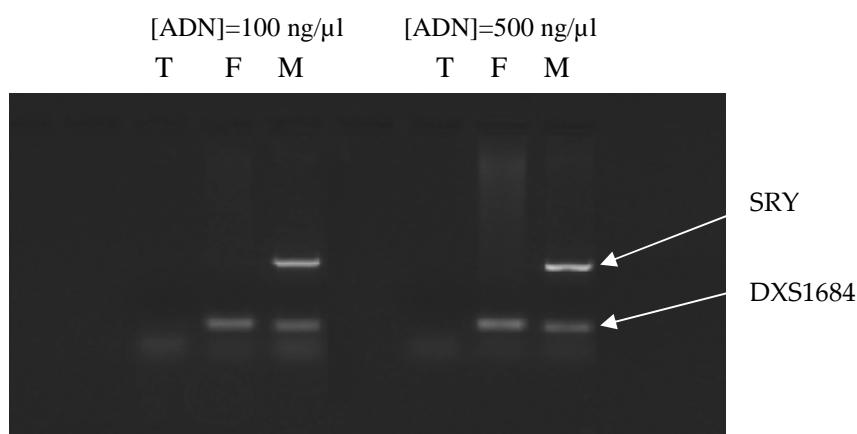


Figure 41: Résultat PCR SRY/DXS1684, gamme de concentration
T: Témoin négatif; F:Femelle; M: Mâle

Le résultat (figure 41) montre la disparition des traces légères de trainées en présence d'une concentration plus faible d'ADN (100 ng/μl). Cette concentration a été retenue dans la suite des expériences.

Effectivement trop d'ADN gêne la réaction de PCR.

La mise au point, ainsi établie, a permis d'obtenir des bandes nettes sans smear, (les conditions ajustées figurent dans le tableau 8 page 49).

V- Résultat de la PCR SRY/DXS1684 des patients

La PCR du gène SRY a été appliquée à trois groupes de patients:

- ▣ Les Turner (P1 à P3) dont théoriquement 12% disposent du gène SRY dans leur génome (ce qui indique la présence de risque de développer des gonadoblastomes comme il a été signalé en paragraphe de Turner dans la revue bibliographique, p 25).
- ▣ Les femmes XY (P4 à P6) pour chercher l'étiologie du phénotype féminin où on suspecte l'absence du gène SRY.
- ▣ Les patients 45,X/46,XY (P7 et P8) pour approfondir la recherche et contribuer à la compréhension de l'étiologie.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 42.

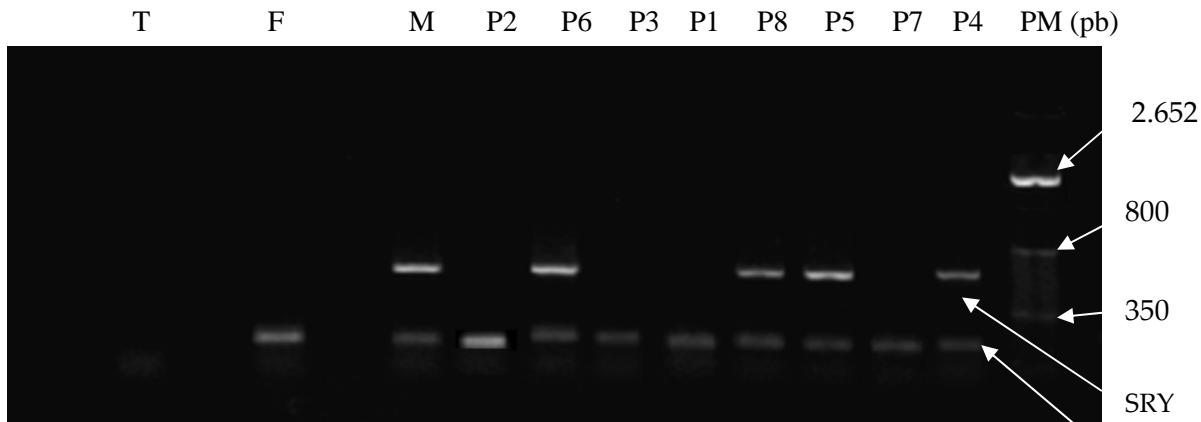


Figure 42: Résultat de PCR SRY/DXS1684 des femmes XY, les Turner et les 45,X/46,XY DDXS1684
T: Témoin négatif; F:Femelle; M: Mâle; Px: Patient x; PM: Poids moléculaire

Le résultat montre que la bande de DDXS1684 est présente chez tous les patients, alors que la bande SRY n'est présente que chez P4, P5, P6 et P8.

■ On constate que les Turner testés (P1, P2 et P3) ne disposent pas de SRY dans leur matériel génétique, donc, ils ne font pas partie des 12% exposés au risque de développement de gonadoblastomes.

Ainsi, Pour les patients Turner homogènes et en mosaïque aucune démarche de gonadectomie ne sera mise en place.

■ Le résultat montre également que toutes les femmes XY testées (P4, P5, et P6) disposent du gène SRY dans leur matériel génétique. Ceci élimine l'hypothèse de délétion du gène SRY. L'étape suivante consiste à séquencer ce gène pour vérifier la présence de mutations chez ces patients.

■ Pour les patients 45,X/46,XY, le P8 dispose du gène SRY, alors que le P7 n'en a pas.

- En ce qui concerne le patient P7, la FISH montre la présence d'une hybridation via la sonde LSI SRY, alors que la PCR SRY/DXS1684 indique l'absence du gène SRY. ceci n'est pas contradictoire, car la sonde LSI SRY qui s'étend sur 120 Kb (figure 43) pourrait s'hybrider au voisinage de SRY même en absence de celui-ci qui est de faible taille (2Kb). Par contre la PCR est très spécifique quand il s'agit d'une séquence bien définie, flanquée par les amorces.

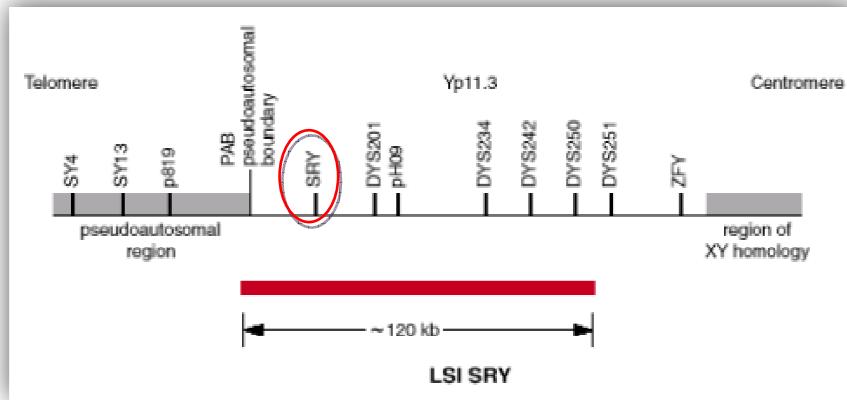


Figure 43: Carte de la sonde LSI SRY

- On peut constater que le phénotype ambiguë du patient P7 pourrait être dû, en plus du mosaïsme, à l'absence du gène SRY des chromosomes Y. Alors que pour le patient P8 le phénotype observé n'est pas en relation avec le gène SRY.

La PCR simplexe des deux parties du gène SRY (illustrée dans le chapitre matériaux et méthodes) a été établi, d'une part, afin de vérifier l'efficacité des amorces qui seront utilisées par la suite dans le séquençage, et d'autre part, pour s'assurer de l'absence de contaminants dans le produit PCR consacré au séquençage. Celui ci concerne dans notre cas les femmes XY pour lesquelles on suspecte des mutations au niveau du gène SRY. Le résultat obtenu est illustré dans la figure 44.

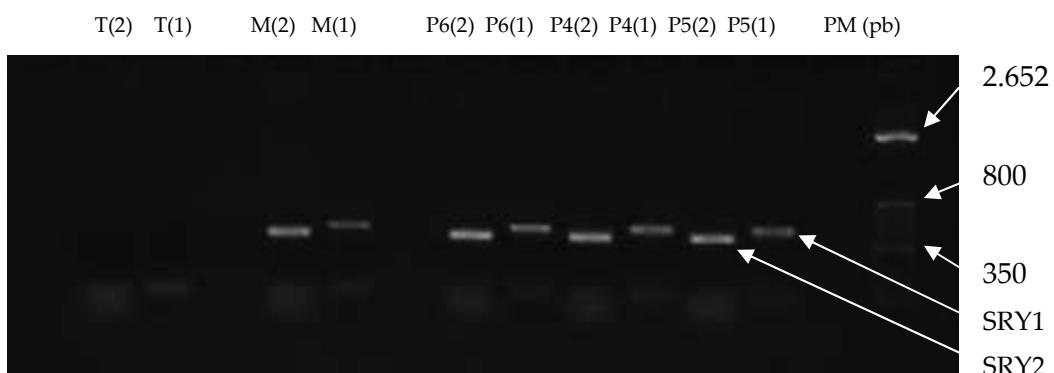


Figure 44: Résultat de la PCR simplexe de SRY1 et SRY2 des patients P5 à P7
T: Témoin négatif; F:Femelle; M: Mâle; Px: Patient x; PM: Poids moléculaire

Le résultat obtenu montre que le produit qui sera séquencé par la suite ne contient pas de contaminants, et que la taille des bandes obtenues correspond à celle des bandes attendues.

VI- Résultat du séquençage

Le gène des trois patients a été séquencé (figure 45), puis chaque séquence a été alignée à la base de données du génome humain grâce au BLAST.

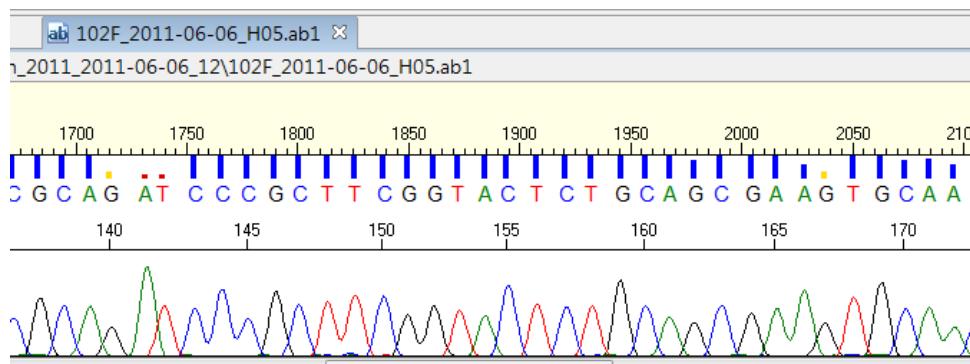


Figure 45: Exemple de résultat du séquençage

■ Après alignement et correction des séquences, les résultats ont montré qu'aucune mutation ne figure sur le gène SRY du patient P4 (figures 46 et 47).

GENE ID: 6736 SRY | sex determining region Y [Homo sapiens]
(Over 100 PubMed links)

Score = 475 bits (257), Expect = 4e-132
Identities = 257/257 (100%) Gaps = 0/257 (0%)
Strand: Plus/Minus

Query 1	TGATCTCTGAGTTTCGCATTCTGGGATTCTCTAGAGCCATCTGCCCTCTGATCGCGAG	60
Sbjct 419	TGATCTCTGAGTTTCGCATTCTGGGATTCTCTAGAGCCATCTGCCCTCTGATCGCGAG	360
Query 61	ACACACGATGAATGC GTT CATGGGT CGCTT CACTCT ATCCTGGACGTTGCCTTACTGT	120
Sbjct 359	ACACACGATGAATGC GTT CATGGGT CGCTT CACTCT ATCCTGGACGTTGCCTTACTGT	300
Query 121	TTTCTCCCGTTTCAACTGATACTTAGAGTTACAGCTTCAGTGCAAAGGAAGGAAGAGC	180
Sbjct 299	TTTCTCCCGTTTCAACTGATACTTAGAGTTACAGCTTCAGTGCAAAGGAAGGAAGAGC	240
Query 181	TTCTCCGGAGAGCGGAAATATTCTCTTGACAGCTGGACTGTAATCATCGCTGTTGAATA	240
Sbjct 239	TTCTCCGGAGAGCGGAAATATTCTCTTGACAGCTGGACTGTAATCATCGCTGTTGAATA	180
Query 241	CGCTTAACATAGCAGAA 257	
Sbjct 179	CGCTTAACATAGCAGAA 163	

Figure 46: Alignement de SRY1 du P4

GENE ID: 6736 SRY | sex determining region Y [Homo sapiens]
(Over 100 PubMed links)

		Score = 599 bits (324), Expect = 3e-169	
		Identities = 324/324 (100%) Gaps = 0/324 (0%)	
		Strand Plus/Plus	
Query	1	TGCACAGAGAAAATACCGAATTATAAGTATCGACCTCGTCGAAAGGCGAAGATGCTGC	60
Sbjct	504	TGCACAGAGAGAAATACCGAATTATAAGTATCGACCTCGTCGAAAGGCGAAGATGCTGC	563
Query	61	CGAAGAATTGCAGTTGCTTCCCGCAGATCCGCTTCGGTACTCTGCAGCGAAGTGCAAC	120
Sbjct	564	CGAAGAATTGCAGTTGCTTCCCGCAGATCCGCTTCGGTACTCTGCAGCGAAGTGCAAC	623
Query	121	TGGACAACAGGTTGTACAGGGATGACTGTACGAAAGCCACACACTCAAGAATGGAGCACC	180
Sbjct	624	TGGACAACAGGTTGTACAGGGATGACTGTACGAAAGCCACACACTCAAGAATGGAGCACC	683
Query	181	AGCTAGGCCACTTACCGCCCATCAACGCAGCCAGCTACCGCAGCAACGGGACCGCTACA	240
Sbjct	684	AGCTAGGCCACTTACCGCCCATCAACGCAGCCAGCTACCGCAGCAACGGGACCGCTACA	743
Query	241	GCCACTGGACAAAGCTGTAGGACAATCGGTAACATTGGCTACAAAGACCTACCTAGATG	300
Sbjct	744	GCCACTGGACAAAGCTGTAGGACAATCGGTAACATTGGCTACAAAGACCTACCTAGATG	803
Query	301	CTCCTTTTACGATAACTTACAGC 324	
Sbjct	804	CTCCTTTTACGATAACTTACAGC 827	

Figure 47: Alignement de SRY2 du P4

Ceci indique que le phénotype de ce patient n'est pas dû à une déficience au niveau du gène SRY.

Pour ce patient l'absence de constatations biologiques et radiologique complique l'interprétation qui va différer largement selon que les gonades sont normales ou réduites et selon que l'examen biologique est normal ou contenant des anomalies.

Ceci indique que les techniques de biologie moléculaire bien que spécifiques, profondes et fiables ne permettent pas de trancher sur le plan diagnostic qu'en présence de bilans cliniques, biologiques et radiologique bien établis.

■ Pour le patient P5, l'alignement montre une identité de 100% entre la séquence SRY1 et la séquence de la base de données (figure 48).

Par contre l'alignement de la partie SRY2 montre une insertion de la base T sur le brin F de la séquence (figure 49). Le pic correspondant (figure 50) étant de faible signal ne permet de confirmer la mutation. Donc pour ce patient, un deuxième séquençage doit être effectué (en raison de l'absence du brin R).

GENE ID: 6736 SRY | sex determining region Y [Homo sapiens]
 (Over 100 PubMed links)

Score = 662 bits (358), Expect = 0.0
 Identities = 358/358 (100%), Gaps = 0/358 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query 5	TTTTTCGGCTTCAGTAAGCATTTCACGGTATCCCAGCTGCTGCTGATCTCTGAGTT	64
Sbjct 466	TTTTTCGGCTTCAGTAAGCATTTCACGGTATCCCAGCTGCTGCTGATCTCTGAGTT	407
Query 65	TCGCATTCTGGGATTCTAGAGCCATCTTGCCTCTGATCGCGAGACCACACGATGAA	124
Sbjct 406	TCGCATTCTGGGATTCTAGAGCCATCTTGCCTCTGATCGCGAGACCACACGATGAA	347
Query 125	TGCGTTCATGGGTCGTTCACTCTATCCTGGACGTTGCCTTACTGTTTCTCCGTTTC	184
Sbjct 346	TGCGTTCATGGGTCGTTCACTCTATCCTGGACGTTGCCTTACTGTTTCTCCGTTTC	287
Query 185	ACACTGATAACTTAGAGTTACAGCTTCAGTGCAAAGGAAGGAAGAGCTTCTCCGGAGAGC	244
Sbjct 286	ACACTGATAACTTAGAGTTACAGCTTCAGTGCAAAGGAAGGAAGAGCTTCTCCGGAGAGC	227
Query 245	GGGAATATTCTCTTGACAGCTGGACTGTAATCATCGCTGTTGAATACGCTAACATAGC	304
Sbjct 226	GGGAATATTCTCTTGACAGCTGGACTGTAATCATCGCTGTTGAATACGCTAACATAGC	167
Query 305	AGAAGCATATGATTGCATTGTCAAAAACAAGGAGAGTGCGACAAAATTGAAAGGTGCC	362
Sbjct 166	AGAAGCATATGATTGCATTGTCAAAAACAAGGAGAGTGCGACAAAATTGAAAGGTGCC	109

Figure 48: Résultat d'alignement de SRY1 du P5

GENE ID: 6736 SRY | sex determining region Y [Homo sapiens]
 (Over 100 PubMed links)

Score = 187 bits (101), Expect = 3e-47
 Identities = 104/105 (99%), Gaps = 1/105 (1%)
 Strand=Plus/Plus

Query 1	GAGCACCACTAGGCCACCTTACCGCCCATCAACGCAGCCAGCTCACCGCAGCAACGGGA	60
Sbjct 677	GAGCACCACTAGGCCAC-TTACCGCCCATCAACGCAGCCAGCTCACCGCAGCAACGGGA	735
Query 61	CCGCTACAGCCACTGGACAAAGCTGTAGGACAATCGGTAAACATT	105
Sbjct 736	CCGCTACAGCCACTGGACAAAGCTGTAGGACAATCGGTAAACATT	780

Figure 49: Résultat de l'alignement de SRY2 du P5

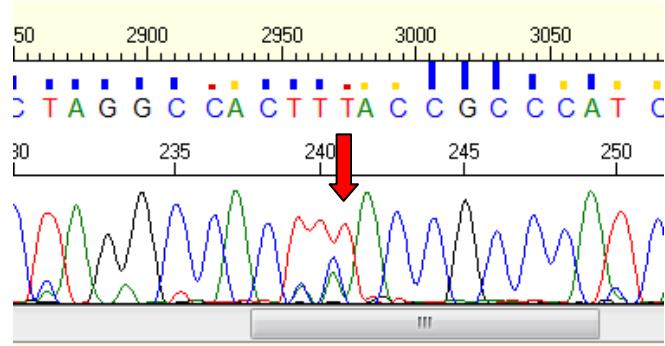


Figure 50: Pic correspondant à l'insertion

■ Pour le patient P6, les résultats ont montré qu'aucune mutation ne figure sur le gène SRY (figures 51 et 52).

[GENE ID: 6736_SRY | sex determining region Y \[Homo sapiens\]](#)
 (Over 100 PubMed links)

Score = 691 bits (374), Expect = 0.0
 Identities = 374/374 (100%) Gaps = 0/374 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query	Subject	Sequence	Length
1	174	TAAGCGTATTCAACAGCGATGATTACAGTCCAGCTGTGCAAGAGAATATTCCCGCTCTCC	60
61	234	GGAGAAAGCTCTTCCTTCCTTGCACTGAAAGCTGTAACTCTAACGTTGAAACGG	120
121	294	GGAGAAAGCTCTTCCTTCCTTGCACTGAAAGCTGTAACTCTAACGTTGAAACGG	293
181	354	TGTGGTCTCGCGATCAGAGGCAGATGGCTTAGAGAATCCCAGAATGCGAAACTCAG	240
241	414	AGATCAGCAAGCAGCTGGGATACCAGTGGAAAATGCTTACTGAAGCCGAAAATGCCAT	300
301	474	TCTTCCAGGAGGCACAGAAATTACAGGCCATGCACAGAGAGAAATACCGAATTATAAGT	360
361	534	ATCGACCTCGTCGG 374	
		ATCGACCTCGTCGG 547	

Figure 51: Alignement de SRY1 du P6

[GENE ID: 6736_SRY | sex determining region Y \[Homo sapiens\]](#)
 (Over 100 PubMed links)

Score = 560 bits (303), Expect = 6e-159
 Identities = 303/303 (100%) Gaps = 0/303 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query	Subject	Sequence	Length
3	528	ATAAGTATCGACCTCGTCAAAGGCGAAGATGCTGCCGAAGATTGCAGTTGCTCCCG	62
63	588	CAGATCCGCTCGGTACTCTGCAGCGAAGTGCACACTGGACAACAGGTTGTACAGGGATG	122
123	648	ACTGTACGAAAGCCACACACTCAAGAATGGAGCACCGAGCTAGGCCACTTACGCCATCA	182
183	708	ACCGAGCCAGOTCACCGCAGCAACGGGACCGTACAGCCACTGGACAAAGCTGTAGGACA	242
243	768	ATCGGGTAAACATTGGCTACAAAGACCTACCTAGATGCTCCTTTACGATAACTTACAGC	302
303	828	CCT 305	
		CCT 830	

Figure 52: alignement de SRY2 du P6

Ceci indique que le phénotype féminin du patient P6 n'est pas en relation avec la déficience du gène SRY.

Si on compare ce cas à la littérature, on pourrait dire que les signes cliniques, biologiques et radiologiques combinés aux résultats cytogénétiques et moléculaires du patient P6 montrent un profil qui est proche de l'insensibilité aux androgènes. En effet, le gène SRY

normal élimine l'hypothèse de son implication dans le trouble décrit. La FSH et la 17β estradiol basses indiquent un bon fonctionnement des androgènes masculins. L'absence de l'utérus et des ovaires montre que les OGI ne sont pas de type féminin. Par contre le phénotype tend vers un profil féminin. Ceci indique que la déficience concerne plutôt le passage du message de virilisation qui, à l'état normal, dépend de l'activité du récepteur des androgènes. Pour vérifier cette hypothèse, il faut séquencer le gène AR codant pour le récepteur des androgènes.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Les troubles de différenciation sexuelle constituent le résultat d'anomalies ayant survenues au cours de la différenciation sexuelle de l'individu. Le diagnostic de ces anomalies nécessite des analyses et des bilans divers, notamment, les analyses cytogénétiques et moléculaires.

A travers l'étude de 17 cas de patients adressés à l'unité de génétique médical et d'oncogénétique du CHU Hassan II de Fès, on a pu mettre en évidence le rôle de chacun des examens génétiques dans l'établissement du diagnostic, de l'étiologie et de la démarche thérapeutique de certains troubles de différenciation sexuelle.

Dans un premier temps on a pu classer les patients en catégories selon leur formule génotypique, ensuite, grâce au caryotype on a pu diagnostiquer certains troubles de différenciation sexuelle tels que le syndrome de Turner et de Klinefelter. D'autres troubles ont été diagnostiqués grâce à la combinaison avec les résultats biologiques, cliniques et radiologiques, c'est le cas de l'hyperplasie congénitale des surrénales.

Ainsi on a pu prendre en charge les patients atteints et leur prescrire les traitements possibles.

Par contre, le diagnostic de certains troubles a été difficile par cytogénétique seul, pourtant, celle-ci a permis de mettre en place les pistes de recherche, comme pour le cas des femmes XY.

La FISH, de son côté, a permis de confirmer le résultat du caryotype et de préciser les proportions du mosaïsme sur une population plus large dans un temps court. Elle a permis également de rectifier le résultat du caryotype tel que le cas du patient 46,XX/45,X/46,XY.

La PCR SRY/DXS1684, quant à elle, nous a permis d'établir une prise en charge assez complète pour les patients Turner par élimination du souci de gonadoblastomes. Pour les femmes XY, la PCR a contribué à la compréhension de l'étiologie par élimination de certaines hypothèses (tels que la délétion du gène SRY). Par contre, pour les patients à dysgénésie gonadique mixte la PCR a été facultative ayant pour but d'approfondir la recherche.

On a pu déduire à partir du séquençage du gène SRY que le résultat de la biologie moléculaire ne peut être utile en absence de constatations cliniques, biologique et radiologiques bien illustrées, et que la recherche d'étiologie nécessite l'exploration d'autres gènes aussi importants que le gène du déterminisme sexuel.

On conclut finalement, que la génétique et la biologie moléculaire, aussi spécifique et fiable qu'elle soit, ne permettent pas de prendre en charge les troubles de différenciation sexuelle sans contribution des autres disciplines.

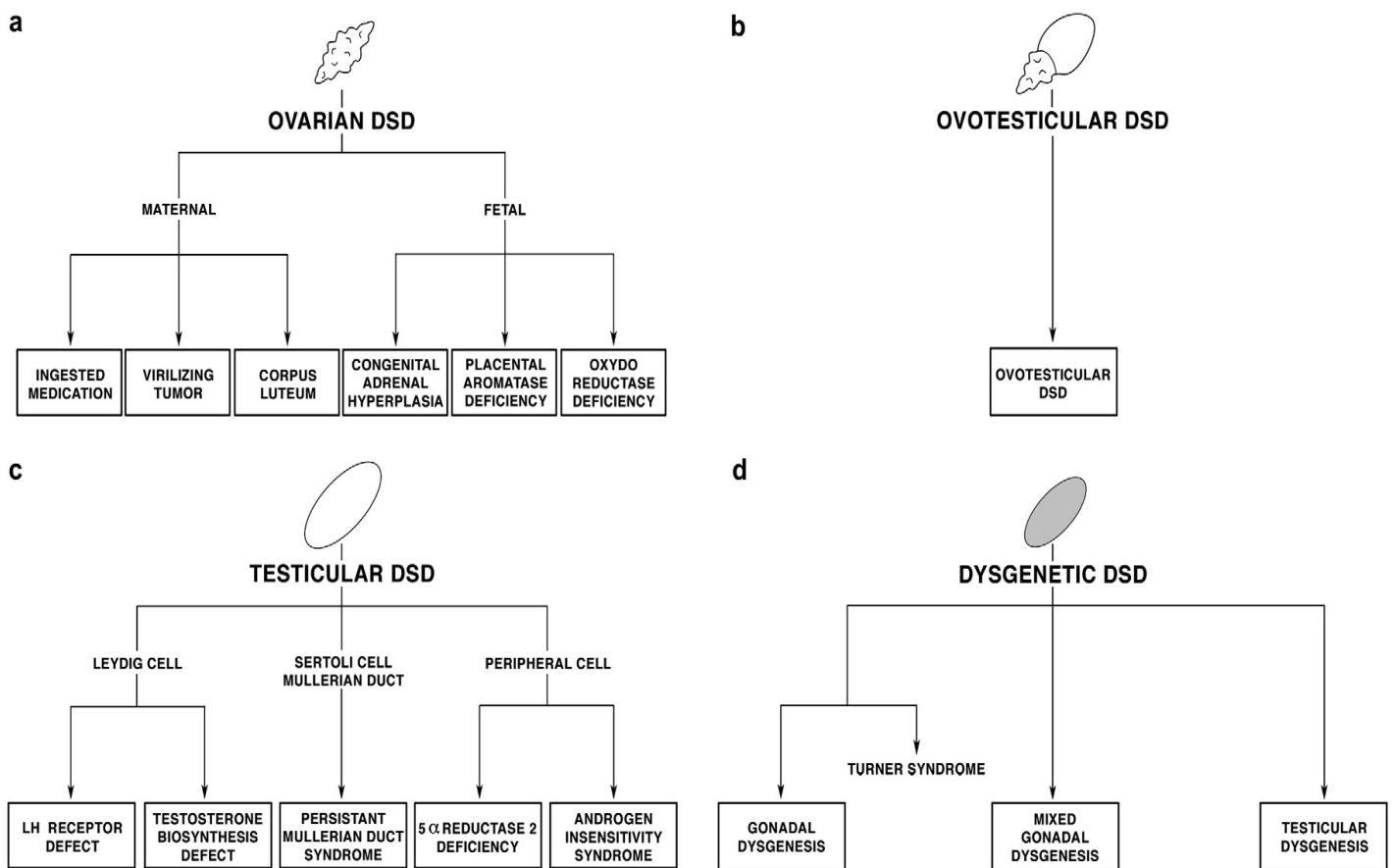
Perspectives

Afin de présenter la meilleure prise en charge aux patients souffrant de troubles de différenciation sexuelle, on pourrait explorer d'autres gènes aussi importants que celui du déterminisme sexuel, tels que le gène du récepteur aux androgènes (AR) et le gène codant pour la 21-hydroxylase.

ANNEXES

Annexe 1

Classification selon Ian A. Aaronson et coll.



A, b, c et d: les quatre catégories de troubles de différenciation sexuelle selon Ian A. Aaronson et coll.

Annexe 2

Classification de Prader

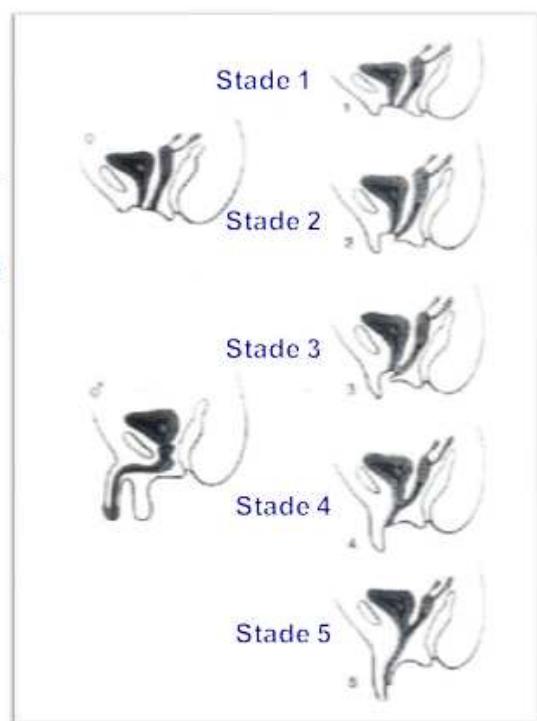
Stade 1: Hypertrophie isolée du clitoris

Stade 2: petit organe péno-clitoridien coudé, vestibule en entonnoir ou débouchent vagin et urètre.

Stade 3: organe péno-clitoridien recouvert d'un prépuce dorsal-fusion presque complète des replis labio-scrotaux entourant un orifice urogénital avec sinus court.

Stade 4: aspect d'hypospade périénal avec sinus urogénital à la base de la verge

Stade 5: verge bien développée avec prépuce circonférentiel complet-orifice urogénital à l'extrémité du gland-scrotum plat et vide.



Annexe 3

Les cas nécessitant une gonadectomie [65].

Table 4 Risk of germ cell malignancy according to diagnosis

Risk group	Disorder	Malignancy risk (%)	Recommended action	No. studies (n)	No. patients (n)
High	GD ^a (+Y) ^b intra-abd.	15–35	Gonadectomy ^c	12	>350
	PAIS non-scrotal	50	Gonadectomy ^c	2	24
	Frasier	60	Gonadectomy ^c	1	15
	Denys-Drash (+Y)	40	Gonadectomy ^c	1	5
Intermediate	Turner (+Y)	12	Gonadectomy ^c	11	43
	17 β -HSD	28	Monitor	2	7
	GD (+Y) ^b scrotal	Unknown	Biopsy ^d and irrad.?	0	0
Low	PAIS scrotal gonad	Unknown	Biopsy ^d and irrad.?	0	0
	CAIS	2	Biopsy ^d and ???	2	55
	Ovotest DSD	3	Testis tissue removal ?	3	426
No (?)	Turner (-Y)	1	None	11	557
	5 α -Reductase	0	Unresolved	1	3
	Leydig cell hypoplasia	0	Unresolved	1	2

^a Gonadal dysgenesis (including not further specified, 46XY, 46X/46XY, mixed, partial, complete).

^b GBY region positive, including the *TSPY* gene.

^c At time of diagnosis.

^d At puberty, allowing investigation of at least 30 seminiferous tubules, preferentially diagnosis based on OCT3/4 immunohistochemistry.

Annexe 4

Constitution des réactifs

Réactifs du cartotype

❖ Earl:

NaCl	6.8 g
KCl	0.4 g
MgSo4	0.1 g
Glucose	1 g
CaCl2	0.2 g
NaH2,PO4	0.14 g
Eau distillée qsp	100 ml

❖ Giemsa

Giemsa	7.5g
Glycerol	250ml
Methanol	750ml

Réactifs de la FISH

❖ 20X SSC

20X SSC	pH 5.3	66g
Eau qsp		250 ml

❖ 2X SSC

20X SSC	pH5.3	10 ml
Eau distillée qsp		100 ml

❖ 2 X SSC / 0.1% NP 40 pH 7

NP40	1 ml
20X SSC	100 ml
Eau distillée	850 ml

❖ 0,4X SSC / 0,3% NP 40	pH 7	
NP40		3 ml
20X SSC		20 ml
Eau distillée		950 ml

Réactifs par Extraction d'ADN par sel

❖ TE 20/5 : (1L)

Tris-HCl 1 M	pH 7,6	20 ml
EDTA disodique 0,5 M	pH 8	10 ml
H ₂ O distillée		

❖ Solution SLB (Lyse des globules blancs)

Tris-HCl 1 M	pH 7,6	10 ml
EDTA disodique 0,5 M	pH 8	20 ml
SDS(Sodium Dodécyl Sulfate) 10%		20 ml
NaCl 5 M		10 ml
Eau stérile		

❖ TE 10/1 : (200 ml)

Tris-HCl 1 M	pH 7,6	2 ml
EDTA disodique 0,5 M	pH 8	400 µl

Gel d'agarose

❖ TAE 50X

Tris-base		242,2g
EDTA 0,5M	pH = 8	100ml
Acide Acétique Glacial		57ml
Eau distillée		qsp 1L

❖ Solution de charge (2 mg/ml) :

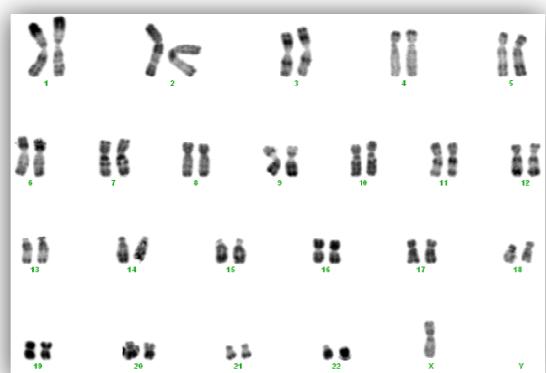
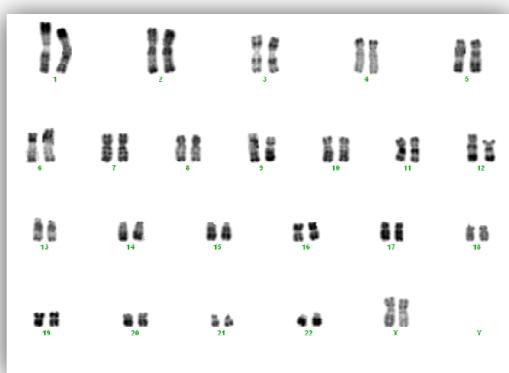
Bleu de bromophénol		200 mg
TRIS-HCl 1M	pH 7,6	10 ml
Glycérol		50 ml
Eau distillée		qsp 100 ml

Annexe 5

Séquence du gène SRY: la séquence de la boîte HMG est en caractères bleus; les amores F et R amplifiant l'exon de SRY de (648pb) sont en jaune; Les amores 1F et 1R amplifiant la première partie de l'exon SRY (475pb) sont en rouge; les amores 2F et 2R amplifiant la deuxième partie de l'exon (410pb) sont en vert.

AGTGTAGCTAACACTCACTGAAACTGTTGAGTTCTAGGTATTTTTCTC
TAAACGAAACAATTACTTTCTAAAAGTCAAATGTTAGCCATCCTAGAAGTTGGGCATAA
AATACTTGTAAGTATGCTAATATTCTGATACTTAATGCCTGTGAAAATGTGTATAGA
ATTTCAATTAAATAGAAGTGAAGAAAAAGCGATAATAATTACTATAATTCAATAT
GCAGTTATGTATGTGTTAGACAAATTAGGTTCTCATTAAGCTTGTGTTTT
TAAAGATAACATACACATATATTGATAATGATAAACAAATTCAATAGCTTTGTGTCCT
CTCGTTTGTGACATAAAAGGTCAATGAAAAAATTGGCGATTAGTCAAATTGCACTTT
TCAGGACAGCAGTAGAGCAGCTAGGGAGGCAGTCAGCAGGGCAAGTAGTCAACGTTACT
GAATTACCATGTTGCTTGAGAATGAATACATTGTCAGGGTACTAGGGGGTAGGCTGGT
TGGCGGGGTTGAGGGGGTGTGAGGGCGGAGAAATGCAAGTTCAATTACAAAAGTTAAC
GTAACAAAGAACATCTGGTAGAAGTGAGTTGGATAGTAAAATAAGT **TTCGAACCTGGCA**
CCTTCAATTGGTGCACACTCTCCTGTTGACATGCAATCATATGCTTCTGCTATG
TTAACCGTATTCAACAGCGATGATTACAGTCCAGCTGTGCAAGAGAAATTCCCGCTCTC
CGGAGAAGCTCTCCTCCTTGCACTGAAAGCTGTAACTCTAAGTATCAGTGTGAAACG
GGAGAAAACAGTAAAGGCAACGTCCAG**GATAGAGTGAAGCGACCCATGAACGCATT**
CATC GTGTGGTCTCGCGATCAGAGGCGCAAGATGGCTCTAGAGAAATCCCAGAATGCGAAACTCA
GAGATCAGCAAGCAGCTGGATACCAGTGAAATGCTTACTGAAGCCAAAAATGCCA
TTCTTCCAGGAGGCACAGAAATTACAGGCCATGCACAGAGAGAAATACCGAATTATAAG
TATCGACCTCGTCGGAAGGCG**AAGATGCTGCCAGAAATTG** **CAGTTGCTCCCGCAGAT**
CCCGCTCGGTACTCTGCAGCGAAGTCAACTGGACAACAGGTTGTACAGGGATGACTGT
ACGAAAGCCACACACTCAAGAATGGAGCACCAGCTAGGCCACTTACCGCCCATCAACGCA
GCCAGCTCACCGCAGCAACGGGACCGCTACAGCCACTGG**ACAAAGCTGTAGGACAATCGG**
GTAACATTGGCTACAAAGACCTACCTAGATGCTCCTTTACGATAACTACAGCCCTCA
CTTCTTATGTTAGTTCAATATTGTTCTCTGGTAATAAAGGCCTATTCA
TTTCA GTTTACTGGTATTCAATTAAACTTAATTCAAGACAAGTTGTGTCACACGA
TTAACATGCAAAGAAATAAGACATCCAGAAGTGAGCCTGCCTATGTTGTGGCGTCAGA
GTACTAACTTGATACAAACGGACACTGTGGCTACTTAAATGCTCTAAATGAGAAACACA
CTTGAAAATTGTACCAAAAAAAATCACACTCTATATGCAGCGTGTAAAGCAGTCCTC
TAGACCGTGATTCAATTGGCTTCACTTGTACGTGTCTATAAATTGAGGTAAC
TAAGGAATGGATATGTAAGCAGGATCAAACCTGTTCTTCTCCCTCACGCTGTGG
AAAAAAACAGTTTACCTCCATTGCAATTCACTGCTTACTCCATATAAATCCAAACG
GTTGACATTCCCTTCAACTAGTTATAAAATGCCCTGGTAAAACAAAATATTAAATTCC
TTGTCATTGGTATCTATGAAACTTATCATTGCTTCTTCTGAAACTATCTTT
AAAAATGGCAATCTACTTGTGTTCCATGGCCTATTAACTTTAAGCCTGTGGAATGAAAAA
TACAG

Annexe 6



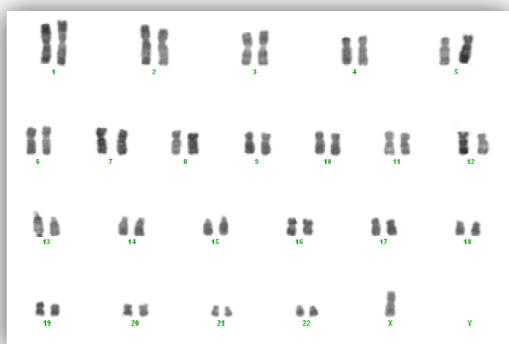
Caryotype du patient P3(Turner)



Caryotype du patient P5 (femme XY)



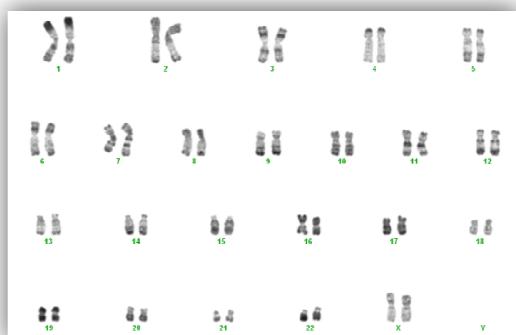
Caryotype du patient P6 (femme XY)



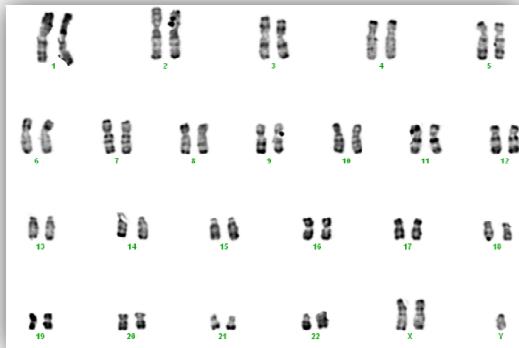
Caryotype du patient P8 (45,X/46,XY)



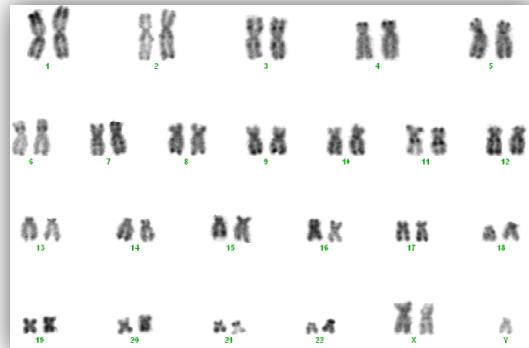
Caryotype du patient P10 (homme XX)



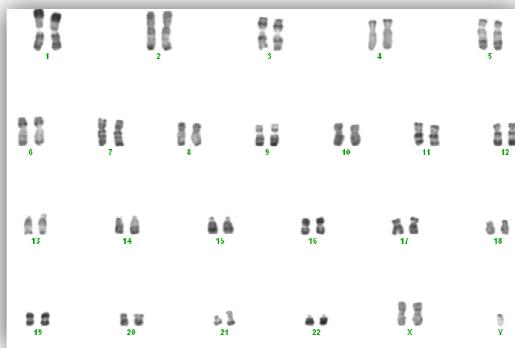
caryotype du patient P11 (homme XX)



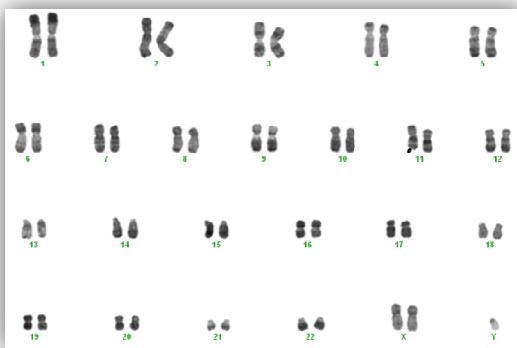
Caryotype du patient P13(Klinefelter)



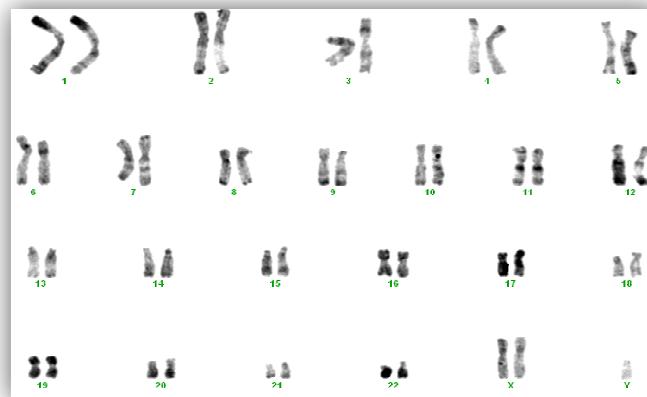
Caryotype du patient P14 (Klinefelter)



Caryotype du patient P15 (Klinefelter)



Caryotype du patient P16 (Klinefelter)



Caryotype du patient P17 (Klinefelter)

Glossaire

Epiblaste	Couche unique de cellules polyédriques représentant le revêtement de l'embryon.
Gastrulation	Troisième stade embryonnaire.
Vésicule vitelline	Une réserve de matière nutritive présente au début de la vie de l'organisme.
Mésenchyme	Tissu de l'embryon à partir duquel sont formés les vaisseaux, les muscles, Le squelette et le cartilage.
Cavité coelomique	Cavité située entre le tube digestif et la paroi du corps.
Granulosa	Masse de cellules folliculaires qui entourent l'ovocyte.
Gène homéotique	Gène responsable du plan d'organisation des êtres vivants, en d'autres termes de la place des organes et des membres les uns par rapport aux autres
Récepteur nucléair orphelin	Régulateur de transcription eucaryote dont le ligand activateur associé N'est pas encore caractérisé
Cryptorchidie	C'est l'arrêt de la migration du testicule en un point quelconque de son trajet normal
Gynécomastie	Hypertrophie des seins chez l'homme.
Mastectomie	Correspond à une intervention chirurgicale qui consiste en l'élimination du sein.
Coelioscopie	Examen permettant de visualiser directement la cavité abdominale, Préalablement percée puis distendue (gonflée) par un gaz (co2), après la pénétration d'une sonde.
Gonadectomie	Ablation des gonades.
Aménorrhée primaire	L'absence de règles chez une adolescente ou une femme n'ayant jamais été réglée.
Aménorrhée secondaire	Absence de règles de plus de 3 mois chez une femme déjà réglée.
Hyperkaliémie	Concentration plasmatique élevée de potassium.
Acidose	Acidité du sang (dont le ph devient inférieur à 7,40).
Hypospadias	L'urètre (le canal qui amène l'urine de la vessie vers l'extérieur) Ne traverse pas le pénis sur toute sa longueur pour déboucher à la pointe de celui-ci, mais se termine de façon anormale à la partie inférieure de la verge.
Hyponatrémie	Faible taux de sodium (na+).
Androgène	Les androgènes sont des hormones mâles (de nature stéroïde) sécrétées par les testicules, les ovaires et les glandes surrénales.
Gonadotrophine	Hormones qui agissent sur les glandes sexuelles en stimulant leur fonction tel que lh, fsh...
Endoscopie	Exploration des cavités profondes et des conduits de l'organisme à l'aide d'un endoscope, instrument flexible constitué de fibres optiques.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] **Ravel C., Chantot-Bastaraud S., Siffroi J.-P.** Aspects moléculaires du déterminisme sexuel : régulation génique et pathologie. Gynécologie Obstétrique & Fertilité 32 (2004) 584–594.
- [2] www.embryology.ch/francais/ugenital/planmodgenital.html
- [3] **Morel Y., Michel-Calemard L., Mallet D.** Anomalies génétiques du récepteur aux androgènes et ambiguïté sexuelle avec fonction testiculaire normale à la naissance. Ann. Endocrinol 66, 3 (2005) 217-224.
- [4] **Encha-Razavi F., Escudier E.** Embryologie. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Gynecologie/Obstétrique 5-001-A-50 (2010).
- [5] **Jan Langman, T.-W.Sadler** (traduction et adaptation française Robert Pagès). Embryologie médicale. Edition pradel, Paris (2000) p308.
- [6] **Braat AK, Speksnijder JE, Zivkovic D.** Germ line development in fishes (Review). Int J Dev Biol 43 (1999) 745-760.
- [7] **Bendel-Stenzel M, Anderson R, Heasman J, Wylie C.** The origin and migration of primordial germ cells in the mouse (Review). Semin Cell Dev Biol 4 (1998)393-400.
- [8] **McLaren A.** Germ cells and germ cell sex. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 350 (1995) 229–33.
- [9] **Adams IR, McLaren A.** Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. Development 129(2002)1155–64.
- [10] **Rodolfo A. Rey, MD, PhD, Senior Researcher, Professor, Romina P. Grinspon, MD.** Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development; Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 25 (2011) 221–238.
- [11] **Barriere P., Langlois M.-L., Mirallie S., Jean M.** Embryologie de l'appareil génital féminin. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Gynécologie 10-A-08 (2007).
- [12] **Morel Y, Mallet D, Menassa R.** La differentiation sexuelle du foetus. Med C/in Endocrinol Diabere (2006) 2-10.
- [13] **Jan Langman, Sadler T.-W.** Langman's Essential Medical Embryology. Lippincott Williams & Wilkins. 2004.
- [14] **Jost A.** Gonadal hormones in the sex differentiation of the mammalian fetus. In: Organogenesis, ed. Ursprung RLD HaH, Holt, Rinehart and Winston Inc: New York, (1965) p. 611-28.
- [15] **Bouvattier C.** Anomalies du développement sexuel 46,XY (anciennement pseudohérmaphrodismes masculins). EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Endocrinologie-Nutrition, (2009) 10-033-B-10.
- [16] **Jost A.** Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. Arch Anat Micr Morph Exp 36 (1947) 271-315.
- [17] **Jost A.** Problems of fetal endocrinology : the gonadal and hypophyseal hormones. Rec Prog Horm Res 8 (1953) 379-418.
- [18] **Jost A.** Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. Arch Anat Micr Morph Exp 36 (1947) 271-315.
- [19] **Robboy SJ, Bentley RC, Russell P, Anderson MC.** Embryologie and disorders of sexual development. In: Pathology of female reproductive tracts. ed. Robboy SJ, Anderson MC, and Russell P, Churchill Livingstone (2001) p. 819-60.
- [20] **Kuttenn F, d'Acremont MF et Mowszowicz I.** Anomalies de la différenciation sexuelle. Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Endocrinologie-Nutrition, 10-033-A-10 (2003) p 26.
- [21] **Ravel C., Siffroi J.-P.** Anomalies de structure du chromosome Y et syndrome de Turner. Gynécologie Obstétrique & Fertilité 37 (2009) 511–518.
- [22] www.wikipedia.com

- [23] **Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, Kuttenn F et al.** Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nature Genet* 17 (1997) 467–470.
- [24] **Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leherte JR, Landrock D, Ziegler U et al.** Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 106 (2001) 319–329.
- [25] **Wilhelm D & Englert C.** The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes & Development* 16 (14) (2002) 1839–1851.
- [26] **Karl J, Capel B.** Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol* 203 (1998) 323–333.
- [27] **Royer-Pokora B, Beier M, Henzler M, Alam R, Schumacher V, Weirich A, et al.** Twenty-four new cases of WTI germline mutations and review of the literature: genotype/phenotype correlations for Wilms tumor development. *Am J Med Genet A* 127 (2004) 249–57.
- [28] **Klamt B, Koziell A, Poulat F, Wicacker P, Scambler P, Berta P, et al.** Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WTI leading to an altered ratio of WTI-/KTS splice isoforms. *Hum Mol Genet* 7 (1998) 709–14.
- [29] **Birk OS, Casiano DE, Wassif CA et al.** The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature* 403 (6772) (2000) 909–913.
- [30] **Tremblay J, Viger RS.** GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology* 142 (2001) 977–986.
- [31] **Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM, Orkin SH.** Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development* 129 (2002) 4627–4634.
- [32] **Biason-Lauber A.** Control of sex development. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 24 (2010) 163–186.
- [33] **Jacobs PA, Ross A.** Structural abnormalities of the Y chromosome in man. *Nature* 210(34) (1966) 352–354.
- [34] **Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M.** Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348 (1990) 448–450.
- [35] **Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al.** A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346 (1990) 240–244.
- [36] **Charles Thibault, Marie-Claire Levasseur.** La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses Editions, paris, 2001, p221.
- [37] **Jager RJ, Harley VR, Pfeiffer RA et al.** A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. *Human Genetics* 90 (4) (1992) 350–355.
- [38] **Battiloro E, Angeletti B, Tozzi MC, Bruni L, Tondini S, Vignetti P, et al.** A novel double nucleotide substitution in the HMG box of the SRY gene associated with Swyer syndrome. *Hum Genet* 100 (1997) 585–587.
- [39] **Pivnick EK, Watchel S, Woods D, Simpson JL, Bishop CE.** Mutations in the conserved domain of SRY are uncommon in XY gonadal dysgenesis. *Hurn Genet* 90 (1992) 308–310.
- [40] **McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M.** A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 3368–3372.

- [41] **Tajima T, Fujieda K, Kouda N, Nakae J, Miller WL.** Heterozygous mutation in the cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450 scc) gene in a patient with 45 XY sex reversal and adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001) 3820–3825.
- [42] **Ramayya MS, Zhou J, Kino T et al.** Steroidogenic factor 1 messenger ribonucleic acid expression in steroidogenic and nonsteroidogenic human tissues: Northern blot and in situ hybridization studies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82 (6) (1997) 1799–1806.
- [43] **Hanley NA, Ball SG, Clement-Jones M et al.** Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mechanisms of Development* 87 (1–2) (1999) 175–180.
- [44] **Sekido R & Lovell-Badge R.** Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453 (7197) (2008) 930–934.
- [45] **Lin L & Achermann JC.** Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sexual Development* 2 (4–5) (2008) 200–209.
- [46] **Biason-Lauber A & Schoenle EJ.** Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor 1 (NR5A1/SF-1) and adrenocortical insufficiency. *American Journal of Human Genetics* 67 (6) (2000) 1563–1568.
- [47] **Lourenco D, Brauner R, Lin L et al.** Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *The New England Journal of Medicine* 360 (12) (2009) 1200–1210.
- [48] **Sekido R, Bar I, Narvaez V et al.** SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Developmental Biology* 274 (2) (2004) 271–279.
- [49] Lovell-Badge R. Sex-determining genes in mice: building pathways . Wiley, (2002).
- [50] **Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J.** Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet* 87 (1999) 349–53.
- [51] **Biason-Lauber A, Konrad D, Meyer M et al.** Ovaries and female phenotype in a girl with 46, XY karyotype and mutations in the CBX2 gene. *American Journal of Human Genetics* 84 (5) (2009) 658–663.
- [52] **Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortes L et al.** SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Development* 91 (2000) 403–407.
- [53] **Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-Vanhouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA.** Wilms' Tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 93 (1998) 445–454.
- [54] **Jordan BK, Mohammed M, Ching ST et al.** Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *American Journal of Human Genetics* 68 (5) (2001) 1102–1109.
- [55] **Mandel H, Shemer R, Borochowitz ZU et al.** SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *American Journal of Human Genetics* 82 (1) (2008) 39–47.
- [56] **Crisponi L, Deiana M, Loi A et al.** The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis / ptosis / epicanthus inversus syndrome. *Nature Genetics* 27 (2) (2001) 159–166.
- [57] **Cocquet J, Pailhoux E, Jaubert F et al.** Evolution and expression of FOXL2. *Journal of Medical Genetics* 39 (12) (2002) 916–921.
- [58] **Pisarska MD, Bae J, Klein C et al.** Forkhead 12 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology* 145 (7) (2004) 3424–3433.

- [59] **Pannetier M, Fabre S, Batista F et al.** FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *Journal of Molecular Endocrinology* 36 (3) (2006) 399–413.
- [60] **Mauvais-Jarvis P, Mowszowicz I, Kuttenn F.** Significance of 5a-reductase activity in human sexual differentiation. In : Serio M ed. Sexual Differentiation. Basic and clinical aspects. New York : Raven Press (1984) 247-260.
- [61] **Dreger AD, Chase C, Sousa A, Gruppuso PA, Frader J.** Changing the nomenclature/taxonomy for intersex: a scientific and clinical rationale. *J Pediatr Endocrinol Metab* 18 (2005) 729-33.
- [62] **Houk CP, Hughes IA, Ahmed SS, Lee PA.** International intersex consensus conference: special article. *Pediatrics* 118 (2006) 753-757.
- [63] **Lee PA, Houk CP, Ahmed SS.** Consensus statement on management of intersex disorders. *Pediatrics* 118 (2006) 488-500.
- [64] **Aaronson I.A., Aaronson A.J.** How should we classify intersex disorders?. *Journal of Pediatric Urology* 6 (2010) 443-446.
- [65] **Hughes I.A., Houk C., Ahmed S.F., Lee P.A.** Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society (LWPES)/European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) Consensus Group. Consensus statement on management of intersex disorders. *Journal of Pediatric Urology* 2 (2006) 148-162.
- [66] **Barbaro M., Wedell A., Nordenström A.** Disorders of sex development. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 16 (2011) 119-127.
- [67] **Klinefelter HF, Reifenstein EC, Albright F.** Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without a leydigism and increased excretion of follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol* 2 (1942) 447-461.
- [68] **Briard M.-L., Morichon-Delvallez N.** Anomalies chromosomiques. EMC (Elsevier SAS, Paris), Pediatrie, 4-002-T-30 (2006).
- [69] **Bauduceau B, Mayaudon H, Dupuy U et Desangles F.** SYndrome de klinefelter. Encycl Med Chir (Editions Scientifiques médicales Elsevier SAS, Paris tour droits réservés), Endocrinologie Nutrition 10-032-E-20 (2001) 6 p.
- [70] **Cabrol S.** Le syndrome de turner. *Annale d'endocrinologie* 68 (2007) 2-9.
- [71] **Christin-Maitre S.** Le syndrome de Turner : protocole national de diagnostic et de soins. *Gynecologie Obstetrique & Fertilité* 36 (2008) 826-827.
- [72] **Grumbach MM, Conte FA.** Disorders of sex differentiation. In : Wilson JA, Foster DW eds. Williams textbook of endocrinology, 9e ed. Philadelphia : WB Saunders (1998) 960-985.
- [73] **Pasquino AM, Passeri F, Pucarelli I, Segni M, et al.** Spontaneous pubertal development in Turner's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82 (1997) 1810-1813.
- [74] **Massa G, Heinrich C, Verlinde S, Thomas M, et al.** Late or delayed induced or spontaneous puberty in girls with Turner syndrome treated with growth hormones does not affect final height. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (2003) 4168-4174.
- [75] **Hovatta O, Hreinsson J, Fridstrom M, Borgstrom B.** Int Congr Series 1298 (2006) 185-189.
- [76] **Gravholt CH, Fedder J, Naeraa RW, Muller J.** Occurrence of gonado-blastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material: a population study. *J Clin Endocrinol Metab* 85 (2000) 3199-3202.
- [77] **Pienkowski C, Menendez M, Cartault A, Lorenzini F, Lesourd F, Tauber M.** Syndrome de Turner et procréation. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 36 (2008) 1030-1034.
- [78] www.orpha.net/cgi-bin/OC_Exp.php?Ingr=EN&Expert=1772
- [79] www.orpha.net/

- [80] **Lina Michala, MRCOG, Consultant Gynaecologist a, Sarah M Creighton, MD, FRCOG, Consultant Gynaecologist.** The XY female. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology 24 (2010) 139–148.
- [81] **Veitia R, Ion A, Barbaux S et al.** Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46, XY female phenotype. Human Genetics 99 (1997) 648–652.
- [82] **Fallat ME & Donahoe PK.** Intersex genetic anomalies with malignant potential. Current Opinion in Pediatrics 18 (2006) 305–311.
- [83] **Fukami M, Wada Y, Miyabayashi K et al.** CXorf6 is a causative gene for hypospadias. Nature Genetics 38 (2006) 1369–1371
- [84] **Bardoni B, Zanaria E, Guioli S et al.** A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. Nature Genetics 7 (1994) 497–501.
- [85] **Rey RA, Belville C, Nihoul-Fékété C et al.** Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimüllerian hormone measurement. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 84 (1999) 627–631.
- [86] **Kohler B, Lin L, Mazen I et al.** The spectrum of phenotypes associated with mutations in steroidogenic factor 1 (SF-1, NR5A1, Ad4BP) includes severe penoscrotal hypospadias in 46, XY males without adrenal insufficiency. European Journal of Endocrinology 161 (2009) 237–242.
- [87] **Josso N & Briard ML.** Embryonic testicular regression syndrome: variable phenotypic expression in siblings. J Pediatr 97(2) (1980) 200–204.
- [88] **Cussenot O., Fournier G.** Progès en urologie. Rapport du congrès 2000 de l'association Française d'Urologie. Ed. Vingt et un. Paris 10 (2000) 970-971.
- [89] **Bose HS, Sugawara T, Strauss 3rd JF, Miller WL.** The pathophysiology and genetics of congenital lipoid adrenal hyperplasia. N Engl J Med 335 (1996) 1870-1878.
- [90] **Bongiovanni AM, Kellenbenz G.** The adrenogenital syndrome with deficiency of 3b-hydroxysteroid dehydrogenase. J Clin Invest 41 (1962) 2086-2092.
- [91] **Krone N, Dhir V, Ivison HE, Arlt W.** Congenital adrenal hyperplasia and P450 oxidoreductase deficiency. Clin Endocrinol (Oxf) 66 (2007) 162-172.
- [92] **Boehmer ALM, Brinkmann AO, Sandkuijl LA, Halley DJJ, Niermeijer MF, Andersson S et al.** 17b-hydroxysteroid dehydrogenase-3deficiency : diagnosis, phenotypic variability, population genetics, and world wide distribution of ancient and de novo mutation. J Clin Endocrinol Metab 84 (1999) 4713-4721.
- [93] **Mendonca B, Inacio M, Arnhold P, Costa MF, Bloise W, Martin RM et al.** Male pseudohermaphroditism due to 17b-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency : diagnosis, psychological evaluation, and management. Medicine 79 (2000) 299-309.
- [94] **Mograbi N, Andersson S.** 17b-hydroxysteroid dehydrogenases : physiological roles in health and disease. TEM 9 (1998) 265-270.
- [95] **Andersson S, Geissler WM, Wu L, Davis DL, Grumbach MM, New MI et al.** Molecular genetics and pathophysiology of 17b-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. J Clin Endocrinol Metab 81 (1996) 130-136.
- [96] **Rossler A.** Steroid 17b-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency in man : an inherited form of male pseudohermaphroditism. J Steroid Biochem Molec Biol 43 (1992) 989-1002.
- [97] **Rossler A, Belanger A, Labrie F.** Mechanisms of androgen production in male pseudohermaphroditism due to 17bhydroxysteroid dehydrogenase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 75 (1992) 773-778.

- [98] **Prader Prader A, Gueriner HP.** Das syndrom des pseudohermaphroditisms masculinus bei kongenitaler Nebennierenrinden-Hyperplasia ohne Androgenüberproduktion (adrenaler pseudohermaphroditisms masculinus). *Helv Paediat Acta* 10 (1955) 397-412.
- [99] **Lam CW, Arlt W, Chan CK, Honour JW, Lin CJ, Tong SF et al.** Mutation of proline 409 to arginine in the meander region of cytochrome P450c17 causes severe 17 alphahydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 72 (2001) 254-259.
- [100] **Hughes IA, Deeb A.** Androgen resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20 (2006) 577-598.
- [101] **Hughes IA.** A novel explanation for resistance to androgens. *N Engl J Med* 343 (2000) 881-882.
- [102] **Josso N, Belville C, di Clemente N & Picard JY.** AMH and AMH receptor defects in persistent Mullerian duct syndrome. *Human Reproduction Update* 11 (2005) 351-356.
- [103] **Kubini K, Zachmann M, Albers N et al.** Basal inhibin B and the testosterone response to human chorionic gonadotropin correlate in prepubertal boys. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85 (2000) 134-138.
- [104] **Huhtaniemi I, Alevizaki M.** Gonadotrophin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20 (2006) 561-576.
- [105] **McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M et al.** A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination : SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 3368-3372.
- [106] **Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J.** Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet* 87 (1999) 349-353.
- [107] **Parma P, Radi O, Vidal V, et al.** R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 38 (2006) 1304-1309.
- [108] **Walker AM, Walker JL, Adams S, Shi E, McGlynn M, Verge CF.** True hermaphroditism. *J Paediatr Child Health* 36 (2000) 69-73.
- [109] **Bargy F, Bouvatier C et Lefèvre H.** Ambiguités sexuelles. *Encycl Méd Chir* (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Pédiatrie, 4-107-B-50 (2000) 8 p.
- [110] **Miller WL.** Genetics, diagnosis and management of 21 hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 78 (1994) 241-246.
- [111] **White PC, Curnow KM, Pascoe L.** Disorders of 11 α -hydroxylase isoenzymes. *Endocr Rev* 15 (1994) 421-439.
- [112] **Simard J, Rheaume E, Sanchez R et al.** Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia due to 3 α -HSD deficiency. *Mol Endocrinol* 7 (1993) 716-728.
- [113] **Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S et al.** Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15 (1994) 342-355.
- [114] **Deladoey J, Fluck C, Bex M, Yoshimura N, Harada N, Mullis PE.** Aromatase deficiency caused by a novel P450 arom gene mutation : impact of absent estrogen production on serum gonadotropin concentration in a boy. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (1999) 4050-4054.
- [115] **Grumbach MM, Auchus RJ.** Estrogen : consequences and implications of human mutations in synthesis and action. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (1999) 4677-4694.
- [116] **Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K.** Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiologi omatase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 72 (1991) 560-566.

- [117] **Mullis PE, Yoshimura N, Kuhlmann B, Lippuner K, Jaeger P, Harada H.** Aromatase deficiency in a female who is compound heterozygote for two new point mutations in the P450arom gene : impact of estrogens on hypergonadotropic hypogonadism, multicystic ovaries, and bone densitometry in childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 82 (1997) 1739-1745.
- [118] **Bouvattier C., David M., Gay C.-L., Bougnères P., Chatelain P.** Conduite à tenir devant une anomalie des organes génitaux externes découverte à la naissance. *Archives de Pédiatrie* 16 (2009) 585-587.
- [119] **Grumbach MM, Hughes IA, Conte FA.** Disorders of sex differentiation. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. *Williams Textbook of Endocrinology*. 10th ed. Saunders; (2003) p. 842-1002.
- [120] **Ahmed SF, Cheng A, Dovey L, et al.** Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85 (2000) 658-665.
- [121] **Morel Y, Rey R, Teinturier C, et al.** Aetiological diagnosis of male sex ambiguity: a collaborative study. *Eur J Pediatr* 161 (2002) 49-59.
- [122] **Olaf Hiort.** Diagnostic pathways in disorders of sex development. *Clinical Biochemistry* 44 (2011) 509.
- [123] **Kassis M., Galacteros F., Ferec C., Delpech M.** Place du conseil génétique en médecine fœtale Role of the genetic advice in foetal medicine. *EMC-Pédiatrie* 2 (2005) 116–150.
- [124] **ALAOUI BELGHITI Y.** Prise en charge des anomalies de différenciation sexuelle: à propos de 16 cas. Thèse de médecine. Faculté de médecine et de pharmacie de Fès. 2011.
- [125] **Meyer-Bahlburg H.F.L.** Lignes de conduite pour le traitement des enfants ayant des troubles du développement du sexe. *Neuropsychiatrie de l'enfance et de l'adolescence* 56 (2008) 339–344.
- [126] **Ramani P, Yeung CK, Habeebu SS.** Testicular intratubular germ cell neoplasia in children and adults with intersex. *Am J Surg Pathol* 17 (1993) 1124-1133.
- [127] **Cools M, Van Aerde K, Kersemaekers AM, et al.** Morphological and immunohistochemical differences between gonadal maturation delay and early germ cell neoplasia in patients with undervirilization syndromes. *J Clin Endocrinol Metab* 90 (2005) 5295-303.
- [128] **Hannema SE, Scott IS, Rajperts-De Meyts E, Skakkebaek NE, Coleman N, Hughes IA.** Testicular development in the complete androgen insensitivity syndrome. *J Pathol* 208 (2006) 518-527.
- [129] **Cabrol S, Saab C, Gourmelen M, Raux-Demay MC, Le Bouc Y.** Syndrome de Turner : croissance statural et maturation osseuse. *Arch Pediatr* 3 (1996) 313–318.
- [130] **Davison RM, Fox M, Conway GS.** Mapping of the *POF1* locus and identification of putative genes for premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 6 (2000) 314–8.
- [131] **Pr J. Léger.** www.orpha.net. 2007.
- [132] **Tardy V et al.** Génétique et prise en charge prénatale des hyperplasies congénitales des surrénales par déficit en 21-hydroxylase. 27e Congrès de la Société Française d'Endocrinologie (Deauville) : 29 septembre-2 octobre 2010.
- [133] **Tohru Yorifuji, Junko Muroi, Mitsukazu Mamada, Ayumi Uematsu, Masahiko Kawai, Toru Momoi, Masayuki Kaji, Chutaro Yamanaka, Tatsutoshi Nakahata.** Analysis of the *SRY* gene in Turner syndrome patients with Y chromosomal material. *J Med Genet* 38(2001) 41.