



**HAL**  
open science

# Étude génétique du développement normal et pathologique des canaux de Müller

Tanguy Watrin

► **To cite this version:**

Tanguy Watrin. Étude génétique du développement normal et pathologique des canaux de Müller. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Rennes 1, 2009. Français. NNT: . tel-00451925

**HAL Id: tel-00451925**

**<https://theses.hal.science/tel-00451925v1>**

Submitted on 1 Feb 2010

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

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



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale Vie-Agro-Santé**

présentée par

**Tanguy WATRIN**

préparée à l'unité de recherche UMR 6061 CNRS, IGDR  
Equipe GPLD – Institut de Génétique et Développement de Rennes  
UFR Sciences de la vie et de l'environnement

---

**Etude génétique  
du développement  
normal et  
pathologique  
des canaux de Müller**

**Thèse soutenue à la Faculté de  
Médecine de Rennes  
le 18 décembre 2009**

devant le jury composé de :

**Yann GUIGUEN**

DR2 INRA – SCRIBE, Campus de Beaulieu,  
Rennes / *Président*

**Yves de KEYZER**

DR2 INSERM – U781, Hôpital Necker,  
Paris / *Rapporteur*

**Stefan NONCHEV**

PU – INSERM/UJF U823, Site Santé,  
Grenoble / *Rapporteur*

**Isabelle PELLERIN**

PU – UMR 6061 CNRS, IGDR,  
Rennes / *Directrice de thèse*

**Daniel GUERRIER**

CR1 INSERM – UMR 6061 CNRS, IGDR,  
Rennes / *Co-directeur de thèse*

Je tiens à remercier en tout premier lieu Isabelle Pellerin et Daniel Guerrier pour tout ce qu'ils ont pu m'apporter depuis tant d'années. Merci pour votre bienveillance constante et pour l'excellente formation que vous m'avez dispensée. Merci en particulier à Daniel pour sa large implication au cours de ces trois ans et pour nos indénombrables discussions.

Je remercie également Stéphane Deschamps pour ses précieux conseils en de multiples occasions et tous domaines confondus, excepté le foot et la musique, ainsi que pour sa bonne humeur communicative.

Merci aux autres membres passés et présents de l'équipe GPLD : Karine Morcel, proche collaboratrice, d'avoir daigné répondre à chacune de mes questions naïves sur la gynécologie ; Francis Omilli pour ses contributions diverses, de manière toujours volontaire ; Valérie Dupé pour sa grande disponibilité et pour son aide systématique à chaque sollicitation ; merci, pêle-mêle, à Agnès, Audrey, Julie, Lucie, Justine pour leur participation à un moment ou à un autre dans ce projet.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance envers les nombreuses personnes de l'institut qui m'ont fait part de leurs commentaires et de leur expérience au cours de ces trois années, notamment les membres de l'équipe EGD que je crois avoir souvent sollicités.

Merci aux potes du labo - Vincent, Oliv', Marie *et al.* - et du dehors - mes chers Ludo et Nico - pour leur soutien permanent et pour tout ce qui fait que les moments plus difficiles le deviennent un peu moins. Merci particulièrement à Maïwenn pour tout un tas de raisons.

Je remercie évidemment mes deux frangins et leur petite famille respective pour la soupape de décompression qu'ils représentent et pour leurs encouragements constants. Enfin, ma plus profonde gratitude va à l'adresse de mes parents, pour leur confiance sans bornes et leur appui inconditionnel, et pour m'avoir toujours laissé une grande latitude dans mes choix.

Mes derniers remerciements vont aux membres de mon jury de soutenance, Yann Guiguen, Yves de Keyzer et Stefan Nonchev, pour avoir accepté si spontanément de juger ces travaux.

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b>	<b>1</b>
<b>INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX</b>	<b>3</b>
<b>RESUME</b>	<b>5</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE - Développement du tractus reproducteur femelle chez les Mammifères</b>	<b>7</b>
<b>I. Embryologie du tractus génital interne femelle</b>	<b>8</b>
A) Mise en place et différenciation des voies génitales internes mâle et femelle	8
1) Le développement conjoint des voies urinaires et génitales	8
2) La différenciation sexuelle du tractus génital interne	10
3) Les gènes majeurs impliqués dans le développement des canaux de Müller	12
B) Variations morphologiques du tractus reproducteur femelle chez les Mammifères et conservation évolutive des acteurs moléculaires	14
<b>II. Revue bibliographique</b>	<b>15</b>
<b>PARTIE 1 - Etude du rôle de la voie Wnt au cours du développement normal du tractus génital chez la souris</b>	<b>30</b>
<b>I. Voies Wnt et développement du tractus génital</b>	<b>31</b>
A) Les voies de signalisation Wnt	31
1) La voie canonique	33
1-1) La $\beta$ -caténine, un co-activateur transcriptionnel	33
1-2) La $\beta$ -caténine et les jonctions adhérentes	34
2) Les voies non-canoniques	35
2-1) La voie Wnt/PCP	35
2-2) La voie Wnt/ $Ca^{2+}$	37
B) Développement du tractus génital : implication d'un nouvel acteur de la voie Wnt ?	37
1) Caractérisation d'un effecteur terminal de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par un test <i>in vitro</i> de régression des canaux de Müller	37
2) <i>mTcf712</i> , un membre de la famille <i>Tcf/Lef</i>	39
<b>II. Etude du rôle de <i>mTcf712</i> au cours du développement du tractus génital chez la souris</b>	<b>42</b>
A) Matériels et méthodes	42
1) Matériels biologiques	42
2) Inhibition du Nonsense-Mediated Decay (NMD) et extraction des ARN totaux	43
3) Protocoles de reverse-transcription	43
4) Protocoles de PCR	44
5) Hybridation <i>in situ</i> (HIS) sur organes isolés	45
5-1) Préparation des organes isolés pour l'HIS	45
5-2) Synthèse des ribosondes	47

5-3) Protocole expérimental d'HIS	47
6) Extraction des protéines totales et western blot	49
B) Résultats	52
1) Etude de la stabilité des ARNm de <i>mTcf7l2</i>	52
2) Hypothèse d'un mécanisme transcriptionnel générant les ARNm alternatifs de <i>mTcf7l2</i> encodant les protéines dépourvues de boîte HMG	54
3) Détermination du profil d'expression spatio-temporel de <i>mTcf7l2</i> au cours du développement du tractus reproducteur mâle et femelle chez la souris	57
3-1) Etablissement du profil d'expression de <i>mTcf7l2</i> par RT-PCR et RT-PCRq	57
3-2) Caractérisation du patron d'expression spatio-temporel de <i>mTcf7l2</i> par HIS sur tractus urogénitaux isolés	64
3-3) Immunodétection des isoformes de <i>mTcf7l2</i>	71
4) Approche fonctionnelle <i>in vivo</i> des isoformes tronquées par transgénèse transitoire chez la souris	72
C) Discussion – perspectives	73
<b>PARTIE 2 - Etude d'une pathologie malformative congénitale affectant le tractus génital féminin : le syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH)</b>	<b>79</b>
<b>I. Développement du tractus génital interne féminin et anomalies müllériennes</b>	<b>81</b>
<b>II. Le syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH)</b>	<b>83</b>
A) Définition du syndrome et données cliniques	83
B) Revue bibliographique	84
<b>III. Recherche des causes génétiques du syndrome MRKH</b>	<b>93</b>
A) Contexte scientifique de l'étude	93
B) Publications	95
1) Identification d'une délétion d'origine maternelle de la région 4q34-qter chez une patiente MRKH : une illustration de l'expressivité variable	95
2) Mise en évidence, au sein d'une cohorte, de patientes MRKH de microdélétions affectant les régions les plus communément associées au DGS	103
3) Microdélétions pathogéniques ou polymorphismes de grande taille ?	137
C) Identification d' <i>ITIH5</i> comme gène candidat du syndrome MRKH	137
1) Cartographie du locus 10p14-15.1	139
2) Analyse de l'expression du gène <i>ITIH5</i> au cours du développement du tractus génital interne	143
2-1) Généralités sur les protéines ITI	143
2-2) Description du profil d'expression spatio-temporel d' <i>Itih5</i> chez la souris	145
2-2-1) Quantification par RT-PCRq du niveau d'expression d' <i>Itih5</i> au cours de la mise en place et de la différenciation du tractus génital interne femelle	147
2-2-2) Caractérisation de l'expression spatiale d' <i>Itih5</i> par HIS	149
D) Discussion – perspectives	149
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>156</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>166</b>

## INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

<b>Figure 1.</b> Le développement urogénital chez les Mammifères, de la mise en place du mésoderme intermédiaire au stade de l’embryon sexuellement indifférencié	9
<b>Figure 2.</b> Différenciation sexuelle du système reproducteur chez les Mammifères	11
<b>Figure 3.</b> Les variations morphologiques du tractus reproducteur femelle observées chez les Mammifères sont liées à une fusion latérale plus ou moins étendue de la partie postérieure des canaux müllériens	13
<b>Figure 4.</b> La voie Wnt canonique ou Wnt/ $\beta$ -caténine	32
<b>Figure 5.</b> Protocole expérimental mis en œuvre pour l’étude des ARN messagers (ARNm) différentiellement exprimés sous l’action de l’AMH	36
<b>Figure 6.</b> Révélation auto-radiographique après migration en gel de polyacrylamide des produits de DDRT-PCR	38
<b>Figure 7.</b> Diversité structurale des protéines Tcf/Lef générée par épissage alternatif et usage de promoteurs alternatifs	40
<b>Figure 8.</b> La bande différentielle spécifiquement induite sous l’action de l’AMH peut correspondre à trois ARNm alternatifs de <i>mTcf7l2</i>	40
<b>Figure 9.</b> Carte du vecteur de clonage et de transcription pSPT18	46
<b>Figure 10.</b> Les ARNm de <i>mTcf7l2</i> ne sont pas des substrats du système de dégradation du NMD	51
<b>Figure 11.</b> La synthèse des isoformes de <i>mTcf7l2</i> dépourvues de domaine de liaison à l’ADN pourrait impliquer un phénomène de rétention de l’intron 9	53
<b>Figure 12.</b> Les régions introniques flanquant l’exon 9 contiennent des éléments de séquences évolutivement très conservés entre Vertébrés	55
<b>Figure 13.</b> Profils d’expression du gène <i>mTcf7l2</i> au cours du développement du tractus urogénital de souris obtenus par RT-PCR	58
<b>Figure 14.</b> Quantification par RT-PCRq du niveau d’expression des différentes classes d’ARNm de <i>mTcf7l2</i> dans le tractus reproducteur en différenciation	60
<b>Figure 15.</b> Validation de la ribosonde BCBD par HIS sur embryons entiers	63
<b>Figure 16a.</b> Profil d’expression spatial et temporel de <i>mTcf7l2</i> dans le tractus urogénital femelle en développement par HIS	65
<b>Figure 16b.</b> Profil d’expression spatial et temporel de <i>mTcf7l2</i> dans le tractus urogénital mâle en développement par HIS	67
<b>Figure 17.</b> Immunodétection des isoformes protéiques de <i>mTcf7l2</i> sur protéines totales extraites de tractus urogénitaux mâle et femelle en développement	70
<b>Figure 18.</b> Développement et différenciation des voies génitales internes chez la femme	80
<b>Figure 19.</b> Anomalies développementales des dérivés müllériens et impact sur la morphologie du tractus génital féminin	82
<b>Figure 20.</b> Séquence de Rokitansky	82

<b>Figure 21.</b> Principe de la technique de MLPA	94
<b>Figure 22.</b> Profils MLPA d'individus sains obtenus à l'aide du kit SALSA <sup>®</sup> MLPA P023-DiGeorge	136
<b>Figure 23.</b> Bilan du bornage de la microdélétion observée chez un fœtus atteint de BRA et d'une aplasie utéro-vaginale	138
<b>Figure 24.</b> Amplification par PCR de la région microdélétée maximale identifiée	141
<b>Figure 25.</b> La famille de protéines ITI : des gènes aux glycoprotéines	144
<b>Figure 26.</b> <i>ITIH5</i> chez l'Homme : structure génomique, ARNm alternatifs et protéines correspondantes	144
<b>Figure 27.</b> Etude par RT-PCR quantitative du profil d'expression d' <i>Itih5</i> dans le foie et le tractus génital femelle au cours de l'embryogenèse chez la souris	146
<b>Figure 28.</b> <i>Itih5</i> est spécifiquement exprimé dans la partie antérieure des dérivés müllériens en cours de différenciation	148
<b>Tableau 1.</b> Séquences nucléotidiques des amorces de réverse-transcription spécifiques du gène <i>mTcf7l2</i>	44
<b>Tableau 2.</b> Séquences nucléotidiques des amorces de PCR spécifiques du gène <i>mTcf7l2</i>	45
<b>Tableau 3.</b> Oligonucléotides utilisés pour l'amplification et le clonage des ADNc d'intérêt en vue de la synthèse des ribosondes	47
<b>Tableau 4.</b> Composition des solutions utilisées pour l'hybridation <i>in situ</i> sur organes isolés	49
<b>Tableau 5.</b> Bilan de l'analyse phénotypique des embryons surexprimant les isoformes G et H de <i>mTcf7l2</i> sous contrôle du promoteur AMHR2	72
<b>Tableau 6.</b> Position au sein du chromosome 10 de marqueurs ciblés en MLPA ou aCGH et leur nombre de copies respectif chez le fœtus étudié	140

## RESUME

La mise en place et la différenciation du tractus génital femelle est un processus développemental complexe. Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans ce processus sont régis par de nombreux gènes et voies de signalisation, entre lesquels les interactions sont multiples. Leur connaissance précise est d'une grande importance d'un point de vue clinique pour la compréhension des mécanismes pathogéniques à l'origine de malformations congénitales. Inversement, l'étude génétique des syndromes malformatifs affectant le tractus reproducteur féminin contribue à la définition des cascades génétiques régulant la mise en place de cet organe essentiel. Dans ce cadre, deux axes de recherche, l'un fondamental, l'autre clinique, ont été suivis dans cette étude.

Dans la première approche, le rôle du gène *mTcf712* a été étudié au cours du développement des voies génitales internes mâle et femelle chez la souris. Ce gène, codant pour un co-facteur transcriptionnel de la voie de signalisation Wnt, est soumis à de nombreux événements d'épissage alternatif menant à la synthèse de plusieurs isoformes protéiques. La caractérisation de son expression dans les canaux de Müller (ébauches embryonnaires des voies génitales internes femelles) en cours de différenciation indique qu'il pourrait être impliqué dans la régulation transcriptionnelle de gènes cibles lors de ce processus. L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude suggère que les produits du gène *mTcf712* participent au développement sexuellement dimorphique du tractus génital interne.

La seconde partie concerne une étude génétique menée sur une cohorte de patientes atteintes du syndrome d'aplasie utéro-vaginale congénitale, dit syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH). Cette étude nous a conduits à caractériser, chez quatre patientes non apparentées, quatre microdélétions au sein des régions critiques du syndrome de DiGeorge, une pathologie malformative congénitale dont le spectre de malformations chevauche celui du syndrome MRKH. La question d'une seule et même entité clinique aux manifestations phénotypiques très variables, ou d'un syndrome dit de gènes contigus selon les cas, peut se poser. La délimitation précise de l'une de ces microdélétions a abouti à la définition d'un gène candidat, *ITIH5*, dont les études préliminaires de profil d'expression chez la souris suggèrent qu'il joue un rôle très important lors du processus de différenciation des canaux müllériens.



## AVANT-PROPOS

L'activité de recherche de l'équipe GPLD (Génétique des Pathologies Liées au Développement) au sein de laquelle j'ai effectué ma thèse est issue de la réunion de deux équipes préexistantes de l'institut et se focalise sur l'étude de deux processus développementaux très distincts : le développement du tractus urogénital et celui du cerveau antérieur. L'originalité de ce groupe est d'aborder ces deux thématiques tant sous l'aspect clinique que fondamental, bénéficiant ainsi de la complémentarité de ces deux approches.

Mon sujet de thèse intègre ces deux aspects, dans le cadre des recherches sur le développement du tractus reproducteur femelle où deux axes sont ainsi développés :

- 1) une approche clinique qui vise à identifier les causes génétiques du syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH), une pathologie malformative affectant le tractus génital féminin,
- 2) un axe de recherche fondamentale dont l'objectif est de préciser les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de l'établissement du tractus génital femelle chez la souris au cours de l'embryogenèse, par l'étude du rôle du gène *Tcf712* dans ce processus développemental.

Dans le but d'offrir une vision intégrée de ces travaux de recherche clinique et fondamentale, ce rapport se divisera en trois grandes parties :

- la première est une introduction générale au développement du tractus reproducteur chez les Mammifères, plus particulièrement focalisée sur les voies génitales internes femelles,
- la seconde concerne notre étude du rôle du gène *Tcf712*, l'un des composants de la voie de signalisation Wnt, dans ce processus organogénétique,
- la troisième fait état de nos avancées sur la recherche de l'étiologie du syndrome MRKH.

Les résultats obtenus au cours de cette étude du développement normal ou pathologique du tractus génital femelle, ainsi que les perspectives ouvertes par ce travail, seront discutés partie par partie, avant une conclusion générale soulignant l'intérêt d'une stratégie mêlant recherche clinique et fondamentale.

# **Introduction générale**

*Développement du tractus reproducteur femelle  
chez les Mammifères*

# Introduction générale

## Développement du tractus reproducteur femelle chez les Mammifères

### I. Embryologie du tractus génital interne femelle

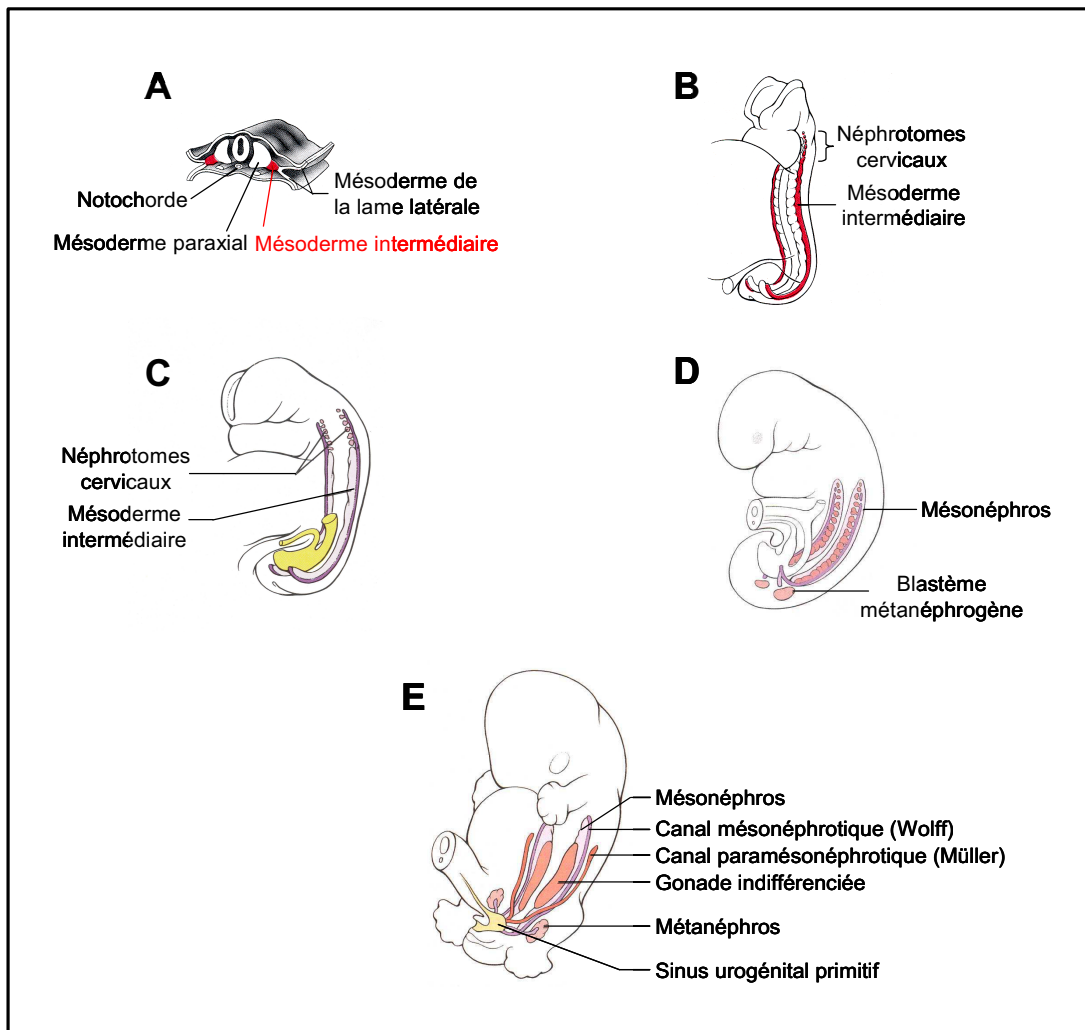
La perpétuation des espèces mammaliennes, et plus généralement de toutes les espèces vertébrées, nécessite l'interaction de gamètes mâle et femelle pour former un zygote, première étape du développement d'un embryon. Le tractus reproducteur femelle chez les Mammifères, composé des oviductes (trompes de Fallope), de l'utérus, du col de l'utérus et du vagin, y assure une fonction essentielle puisqu'il est le siège de la fécondation, de l'implantation et du développement de l'embryon. Malgré son importance pour la continuation des espèces ainsi que pour la santé des femmes, les mécanismes moléculaires et cellulaires gouvernant la mise en place et la différenciation des voies génitales internes femelles commencent seulement à être élucidés. Une grande partie des gènes impliqués dans ce processus développemental a été caractérisée par la description et l'analyse génétique de syndromes humains et par des études de mutagenèse chez la souris, permettant d'établir une cascade génétique émergente.

Cette introduction aborde, dans un premier temps, la mise en place chez l'embryon des ébauches des tractus génitaux mâle et femelle d'un point de vue anatomique puis, brièvement, la différenciation sexuelle du système reproducteur. Les variations morphologiques du tractus génital interne femelle chez les Mammifères seront également évoquées. Enfin, une revue bibliographique conclura cette introduction par une description plus complète des mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine du développement du tractus génital interne femelle, des gènes majeurs impliqués dans ce processus et de l'importance des régulations épigénétiques.

#### A) Mise en place et différenciation des voies génitales internes mâle et femelle

##### 1) Le développement conjoint des voies urinaires et génitales

Comme dans une grande partie du monde animal, la mise en place des systèmes urinaire et génital chez les Mammifères est intimement liée, tous deux provenant de précurseurs communs au cours de l'embryogenèse. Le tractus urogénital est composé des reins, des gonades, des voies urinaires et du tractus reproducteur, et dérive ainsi presque exclusivement du mésoderme intermédiaire. Très rapidement après la gastrulation et de façon concomitante à la prolifération de ce tissu embryonnaire, les crêtes urogénitales vont se former de part et d'autre de l'axe médian de l'embryon, au niveau de la paroi abdominale postérieure.



**Figure 1. Le développement urogénital chez les Mammifères, de la mise en place du mésoderme intermédiaire au stade de l'embryon sexuellement indifférencié.** Le développement du système génital est en rapport étroit avec celui du système urinaire, tous deux dérivant presque exclusivement du mésoderme intermédiaire (A). Ce tissu embryonnaire est à l'origine de trois structures néphrétiques successives : (1) les néphrotomes cervicaux, reins primitifs non fonctionnels et transitoires (B, C) qui seront remplacés par (2) les mésonéphros, reins fonctionnels drainés par les canaux mésonéphrotiques (D, E), puis (3) les métanéphros ou reins définitifs issus de la différenciation du mésoderme intermédiaire induite par les bourgeons urétériques émergeant de la partie distale des canaux mésonéphrotiques (E). Le stade développemental pendant lequel les ébauches embryonnaires des tractus mâle (canal mésonéphrotique ou canal de Wolff) et femelle (canal paramésonéphrotique ou canal de Müller) coexistent est appelé le stade sexuellement indifférencié ou ambissexué (E). Le sinus urogénital primitif, d'origine endodermique, fusionne avec l'extrémité caudale des canaux müllériens pour former le 1/3 inférieur du vagin.

Au sein des ébauches urogénitales, trois structures néphrétiques successives vont se développer suivant une séquence crânio-caudale (**Figure 1**) :

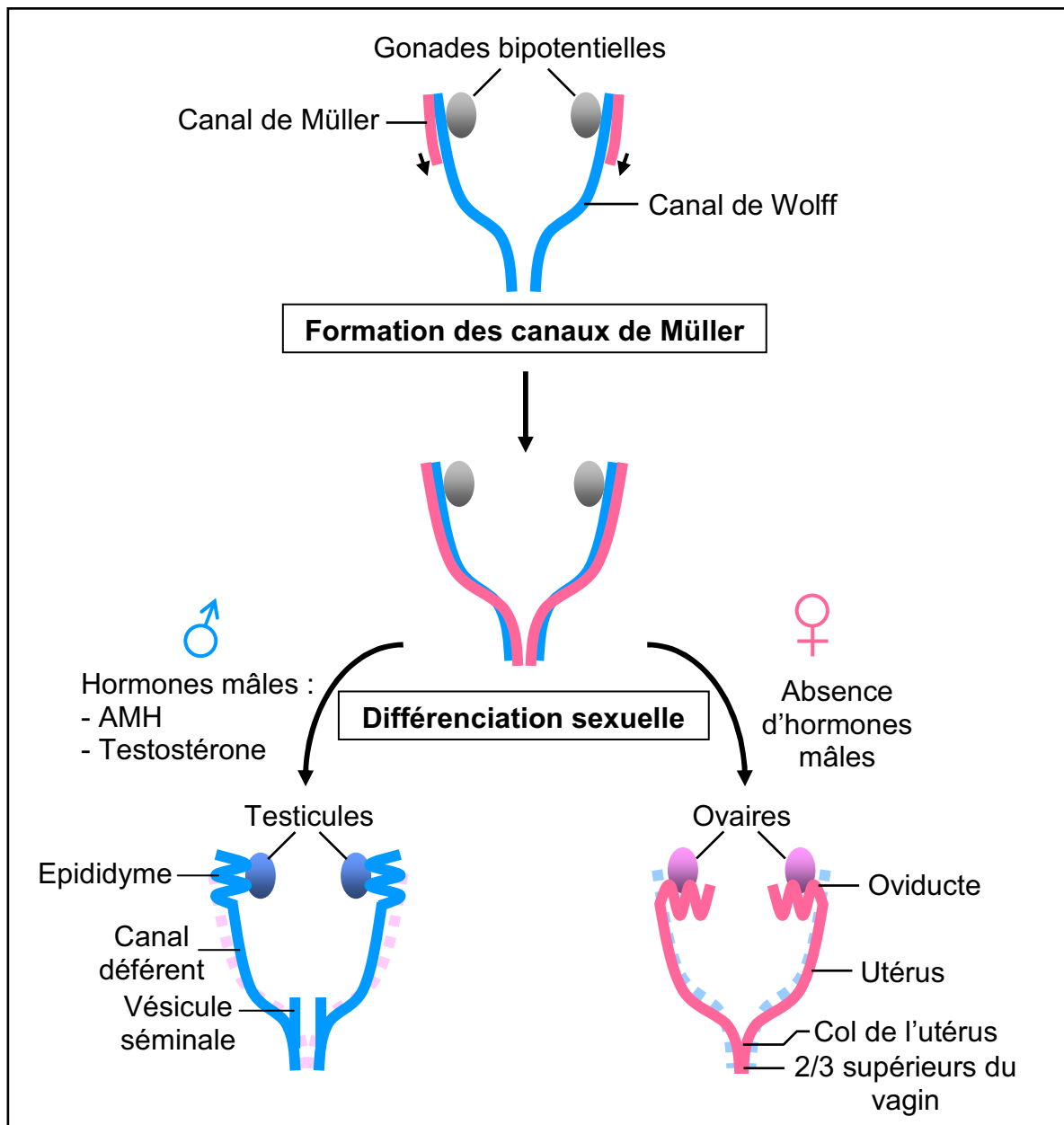
- les néphrotomes cervicaux, rassemblés sous le nom collectif de pronéphros, correspondant à des reins embryonnaires transitoires et non fonctionnels,
- les mésonéphros, reins embryonnaires fonctionnels intermédiaires drainés par les conduits mésonéphrotiques (ou canaux de Wolff),
- les métanéphros, constituant les reins définitifs de l'embryon, induits par les bourgeons urétériques qui émergent de la région distale des conduits mésonéphrotiques.

La migration des cellules germinales primordiales, de la vésicule vitelline vers le mésenchyme de la paroi postérieure du corps qu'elles colonisent, induit la prolifération des cellules du mésonéphros et de l'épithélium cœlomique adjacent, aboutissant à la formation des crêtes génitales. Ces cellules vont alors envahir le mésenchyme de la région présumptive des gonades et s'assembler en cordons sexuels somatiques (ou primitifs) entourant complètement les cellules germinales. Les cellules de ces cordons sexuels se différencieront ultérieurement en cellules de Sertoli chez le mâle, et en cellules folliculaires chez la femelle.

Simultanément, les canaux paramésonéphrotiques (ou canaux de Müller) commencent à se former, chez les embryons mâle et femelle, par invagination de certaines cellules spécifiées de l'épithélium cœlomique juste au côté latéral des canaux mésonéphrotiques. Leur développement se poursuit par élongation caudale jusqu'à atteindre le sinus urogénital auquel ils fusionnent (fusion verticale). A ce stade du développement (6<sup>ème</sup> semaine chez l'Homme, environ 13,5 jours chez la souris), les systèmes génitaux indifférenciés mâle et femelle coexistent encore chez l'embryon jusqu'à ce que le sexe gonadique, déterminé par le sexe génétique, oriente le sens de différenciation des organes génitaux internes et externes.

## 2) La différenciation sexuelle du tractus génital interne

Le développement sexuellement dimorphique chez les Mammifères, *i.e.* l'émergence de deux phénotypes distincts, est un mécanisme sous contrôle de deux paires de chromosomes sexuels : XX pour la femelle et XY pour le mâle. Ce processus est régi par l'expression de nombreux gènes spécifiques du sexe qui régulent la différenciation gonadique et le développement subséquent du tractus reproducteur dans un sens mâle ou femelle en fonction du statut hormonal de l'embryon (Capel, 2000).



**Figure 2. Différenciation sexuelle du système reproducteur chez les Mammifères.** Les ébauches embryonnaires des appareils reproducteurs mâle et femelle (respectivement, les canaux de Wolff et de Müller) coexistent chez l'embryon au stade sexuellement indifférencié. Chez les mâles, l'expression de l'AMH par les cellules pré-sertoliennes des testicules en cours de différenciation provoque la régression des canaux de Müller. La testostérone produite par les cellules de Leydig permet le maintien et la différenciation des canaux wolffiens en épидидymes, canaux déférents et vésicules séminales. Chez les embryons femelles, en l'absence d'AMH et de testostérone, les canaux de Wolff dégénèrent tandis que les canaux de Müller se différencient en oviductes, utérus, col de l'utérus et partie supérieure du vagin. Les canaux de Müller fusionnent dans leur partie postérieure (fusion latérale) pour donner la partie supérieure du vagin.

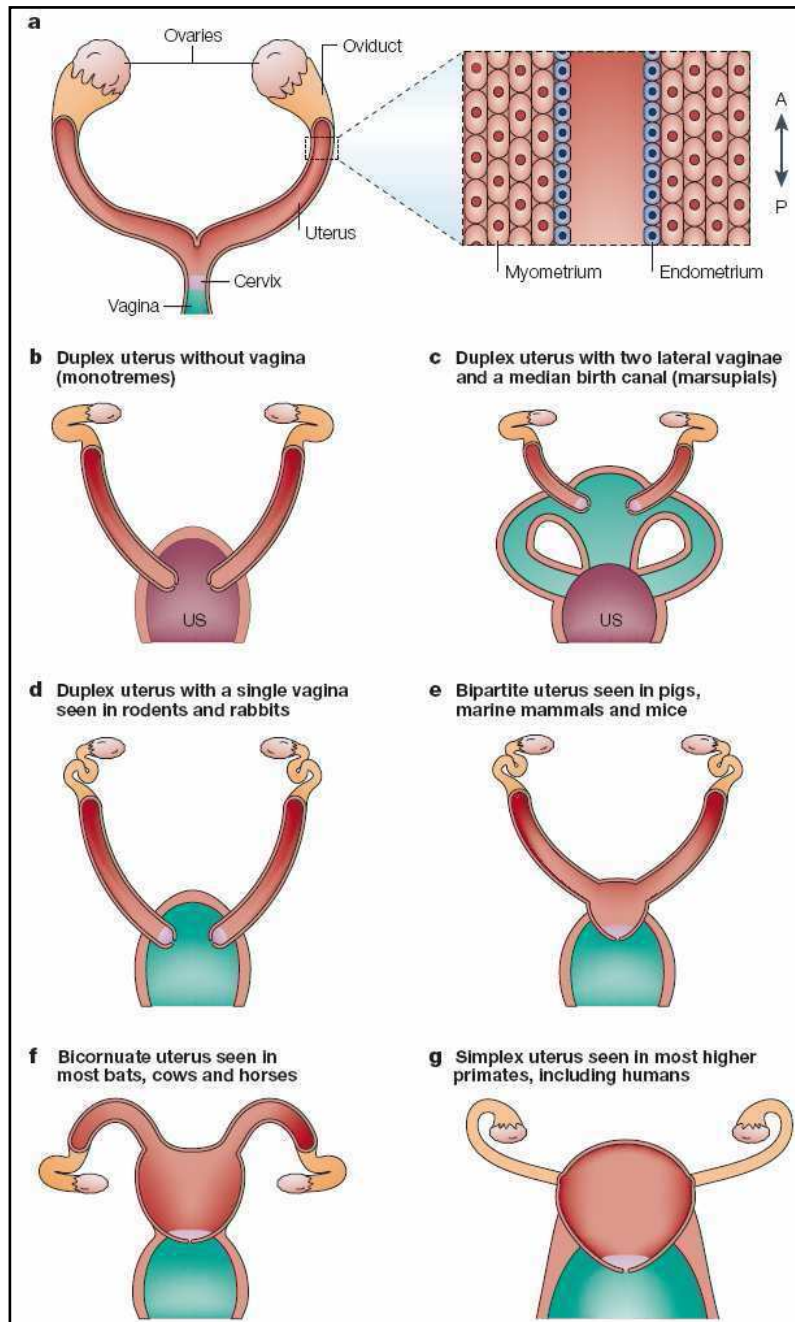
Chez les individus génétiquement mâles, l'expression du gène de détermination testiculaire *SRY* par les précurseurs des cellules de Sertoli aboutit à la différenciation de la gonade bipotentielle en testicules (**Figure 2**). La sécrétion de l'hormone anti-müllérienne (AMH, Anti-Müllerian Hormone ; *alias* MIS, Müllerian Inhibiting Substance) par les cellules sertoliennes fœtales provoque la régression des canaux de Müller. En parallèle, le facteur *SRY* induit indirectement la différenciation de cellules interstitielles de la crête génitale en cellules de Leydig, lesquelles sécrètent la testostérone nécessaire au maintien puis à la différenciation des canaux de Wolff en épididymes, canaux déférents et vésicules séminales. A l'inverse, chez les individus XX, la gonade indifférenciée s'oriente dans le sens ovarien et, en absence de testostérone et d'AMH, les canaux wolffiens dégénèrent tandis que les canaux müllériens se développent pour donner les trompes de Fallope, l'utérus, le col de l'utérus et la partie supérieure du vagin.

Chez les sujets mâles comme chez les sujets femelles, la différenciation des organes génitaux externes dépendra de la présence d'hormones stéroïdes sexuelles spécifiques, androgènes et œstrogènes, respectivement synthétisées par les testicules et les ovaires.

### 3) Les gènes majeurs impliqués dans le développement des canaux de Müller

Des expériences d'inactivation génique, principalement réalisées chez la souris, ainsi que l'étude génétique de syndromes humains ont permis l'identification de nombreux gènes essentiels au développement du tractus reproducteur femelle. En fonction du phénotype observé, ceux-ci ont été classés en trois catégories selon qu'ils sont nécessaires à la formation initiale des canaux de Müller dans les deux sexes, à leur régression chez le mâle ou à leur différenciation chez la femelle.

Les gènes participant au déroulement correct de chacun de ces trois stades développementaux sont l'objet d'une large description dans la revue bibliographique qui conclut cette introduction générale (Cf. **chapitre II**) et ne seront donc pas détaillés ici. On peut toutefois d'ores et déjà citer l'implication de nombreux gènes codant pour des facteurs de transcription à homéodomaine tels *Pax2* (Torres *et al.*, 1995), *Lim1* (Kobayashi *et al.*, 2004) ainsi que les gènes *Hox* (Benson *et al.*, 1996; Gendron *et al.*, 1997; Warot *et al.*, 1997) connus pour leur importance dans la régionalisation des tissus selon l'axe antéro-postérieur (Hombria and Lovegrove, 2003). Les voies de signalisation de l'acide rétinoïque (Mendelsohn *et al.*, 1994) et des glycoprotéines Wnt (Heikkila *et al.*, 2001) jouent également un rôle fondamental dans la formation des canaux de Müller et de leur évolution au cours du développement.



**Figure 3. Les variations morphologiques du tractus reproducteur femelle observées chez les Mammifères sont liées à une fusion latérale plus ou moins étendue de la partie postérieure des canaux müllériens. a) Bases anatomiques communes du tractus reproducteur femelle, *i.e.* ovaires, trompes, utérus, col de l’utérus et vagin. Au niveau utérin, l’épithélium luminal se différenciera en endomètre, le mésenchyme sous-jacent en myomètre. b) Fusion latérale inexistante menant à la formation d’un utérus double sans vagin, directement connecté au sinus urogénital (US). c, d) Fusion limitée au niveau caudal résultant en un utérus double avec structure vaginale. e) La fusion est quasi-absente au niveau utérin, aboutissant au développement d’une paire de cornes utérines. f) Utérus bicorne lié à une fusion relativement étendue antérieurement. g) Un utérus unique associé à un col de l’utérus et à un vagin uniques est le résultat d’une fusion latérale dont la frontière est très antérieure. A, Antérieur (crânial). P, Postérieur (caudal). US, Urogenital Sinus. D’après (Kobayashi and Behringer, 2003).**



Certains de ces gènes, notamment les gènes *Hox*, sont soumis à une régulation endocrine *via* les hormones stéroïdes au cours de l'embryogenèse et lors de la vie adulte (Daftary and Taylor, 2006) et sont la cible de régulations épigénétiques susceptibles d'être contrariées par un environnement endocrinien inadéquat, comme l'exposition *in utero* à des tératogènes tel le diéthylstilbestrol (DES, agoniste œstrogénique) (Newbold, 2008). Cet aspect de la régulation génique sera également abordé dans la revue bibliographique précitée et incluse dans ce mémoire.

#### B) Variations morphologiques du tractus reproducteur femelle chez les Mammifères et conservation évolutive des acteurs moléculaires

La morphologie du tractus reproducteur femelle présente une grande variation parmi les espèces mammaliennes (**Figure 3**). Alors que les mécanismes de formation des canaux müllériens restent similaires, ces différences morphologiques s'expliquent essentiellement par l'étendue variable du phénomène de fusion latérale des canaux de Müller dans leur partie la plus postérieure. Chez les mammifères monotrèmes (comme l'ornithorynque) et les marsupiaux, cette fusion est absente ou très limitée et aboutit à la formation d'un utérus double associé ou non à une structure vaginale. A l'inverse, la plupart des primates supérieurs (dont l'Homme) présentent un utérus unique combiné à un seul col de l'utérus et un vagin unique, une morphologie résultant d'un processus de fusion latérale des canaux de Müller très étendue antérieurement.

En dépit de cette grande diversité dans les caractéristiques morphologiques du tractus reproducteur femelle chez les Mammifères, les cascades génétiques contrôlant le développement de cet organe sont très conservées. De façon inattendue, les acteurs moléculaires de sa mise en place sont également conservés entre Vertébrés et Invertébrés. A titre d'exemple, chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, des mutations au sein du gène *lin-11* (*abnormal cell lineage-11*), orthologue du gène murin *Lim1*, altèrent la morphogenèse utérine et vulvaire (Newman *et al.*, 1999). Dans ce modèle d'étude, le développement vulvaire est aussi sous la dépendance de gènes homéotiques, tel *lin-39* (Maloof and Kenyon, 1998), ainsi que de composants de la voie de signalisation Wnt (Gleason *et al.*, 2002).

Ainsi, la définition des cascades génétiques impliquées dans le développement du système reproducteur tant chez les Vertébrés que chez les Invertébrés devrait apporter une meilleure compréhension des pathologies affectant le tractus reproducteur chez l'Homme.

## II. Revue bibliographique

Cette revue traite des mécanismes moléculaires et cellulaires ainsi que des gènes majeurs impliqués dans la mise en place du tractus reproducteur. Elle aborde également l'importance des régulations épigénétiques dans ce processus développemental.

Masse, J.<sup>#</sup>, Watrin, T.<sup>#</sup>, Laurent, A., Deschamps, S., Guerrier, D., and Pellerin, I. (2009). The developing female genital tract: from genetics to epigenetics. *Int J Dev Biol* **53**, 411-24.<sup>#</sup>, co-auteur.

## The developing female genital tract: from genetics to epigenetics

JULIE MASSÉ<sup>#</sup>, TANGUY WATRIN<sup>#</sup>, AUDREY LAURENT, STÉPHANE DESCHAMPS,  
DANIEL GUERRIER and ISABELLE PELLERIN\*

IGDR, UMR CNRS 6061, Génétique et Développement, IFR 140, Faculté de Médecine, Université de Rennes 1, France

**ABSTRACT** The mammalian female reproductive tract develops from the Müllerian ducts which differentiate, in a cranial to caudal direction, into oviducts, uterine horns, cervix and the anterior vagina. The developmental processes taking place during this organogenesis are notably under the control of steroid hormones, such as members of the *Wnt* and *Hox* families, which regulate key developmental genes. At later stages, steroid hormones also participate in the development of the female genital tract. Chemical compounds homologous to steroids can thus act as agonists or antagonists in fetuses exposed to them. These so-called endocrine disruptors are nowadays found in increasing amounts in the environment and may therefore have a particular impact on such developing organs. Epidemiological studies have revealed that endocrine disruptors have had drastic effects on female health and fertility during the last decades. Furthermore, these adverse effects might be transmitted to subsequent generations through epigenetic modifications. Given the potential hazard of inherited epigenetic marks altering reproduction and/or human health, such molecular mechanisms must be urgently investigated. This review aims to summarize the cellular and molecular mechanisms involved in female genital tract development, to highlight key genes involved in this process and to present epigenetic mechanisms triggered by endocrine disruptors and their consequences in regard to female reproductive tract development.

**KEY WORDS:** *genital tract, Hox, Wnt, genetics, epigenetics*

### Development of the urogenital system

#### **Relation between urinary and genital tracts**

Mammalian genital tract development is closely related to the urinary system embryogenesis. This relation is ancient in evolution and phylogenetically well conserved. In simple organisms like annelids, they both consist in metamerized nephritic tubules composed of a ciliated funnel oriented towards the coelomic cavity and connected to a vascularised duct that opens to the exterior. This system is involved in metabolites and mature genital cells excretion. In higher vertebrates, the urogenital apparatus comprises the kidneys, gonads, urinary and reproductive ducts. The urinary tract embryonic formation is the result of a three steps process that gives rise to three successive structures emerging rostrocaudally in the intermediate mesoderm. Nephrotomes first develop in the cervical part of the embryo; they consist in a ciliated funnel emerging in the coelomic cavity and in a nephritic tubule

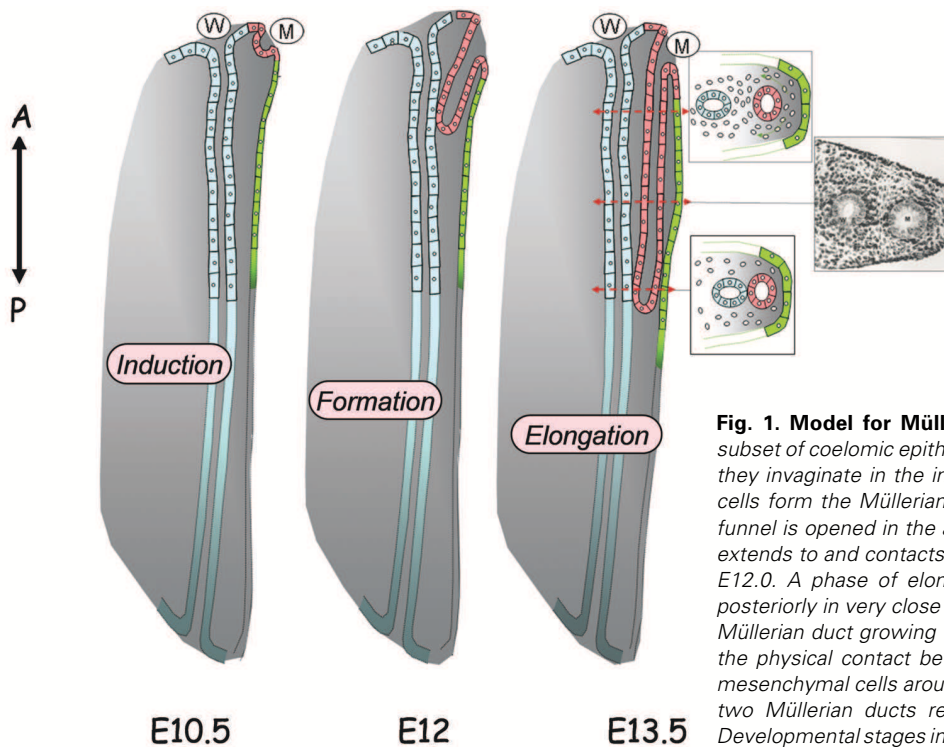
connected to a common excretory duct (the Wolffian duct, WD). At this stage, they form a primitive kidney called pronephros which is not functional. This transitory organ can only be observed in vertebrate embryos and agnathic larvae (Saxen and Sariola 1987; Bouchard *et al.* 2002). Then, while the pronephros is regressing, the mesonephros develops posteriorly, allowing the WD to grow in the same direction. This intermediary kidney, comprising a Bowman capsule and an internal glomerule, is functional and constitutes the major excretory organ of certain species of fishes and anamniotes (Saxen and Sariola 1987; Sainio *et al.* 1997; Sainio and Raatikainen-Ahokas 1999). In higher vertebrates, an ultimate kidney structure develops from the fusion of the most posterior nephrotomes. This so called metanephric kidney or

*Abbreviations used in this paper:* BPA, bisphenol A; DES, diethylstilbestrol; En, n days post-coitum; FRT, female reproductive tract; MD, Müllerian duct; Pn, n days post partum; WD, Wolffian duct.

\*Address correspondence to: Isabelle Pellerin. IGDR, UMR CNRS 6061, Génétique et Développement, IFR 140, Université de Rennes, Campus Villejean, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, CS34317, F-35043 Rennes Cedex, France. Fax. +1-33-2-2323-4478. e-mail: isabelle.pellerin@univ-rennes1.fr

<sup>#</sup>The indicated authors have contributed equally to this work.

Published online: 24 April 2009.



**Fig. 1. Model for Müllerian duct development.** At E11.75, after a subset of coelomic epithelium cells (represented in green) are specified, they invaginate in the intermediate mesoderm. Then, the invaginating cells form the Müllerian duct (M, represented in pink). Anteriorly, the funnel is opened in the abdominal cavity, and caudally, the growing tip extends to and contacts the Wolffian ducts (W, represented in blue) at E12.0. A phase of elongation allows the Müllerian duct to elongate posteriorly in very close contact with the Wolffian duct. As soon as the Müllerian duct growing tip has deposited cells and elongated caudally, the physical contact between the ducts is lost by the appearance of mesenchymal cells around the Müllerian duct epithelium. At E13.5, the two Müllerian ducts reach the urogenital sinus and fuse together. Developmental stages indicated in this figure correspond to mice stages.

metanephros is first connected to the WD, and then to the bladder, through the ureter. The individualization of the metanephros from the mesonephros leads to a separation between urinary and genital tracts; the reproductive tract will later develop from the mesonephros. While in males, the caudal end of the urethra forms a common excretory duct with the spermiduct, a total separation of the female urinary and reproductive tracts occurs, allowing the internal fertilization and subsequently the development of the embryo in the uterus (Oppelt *et al.* 2005a).

As the urinary system develops, another tubular structure called Müllerian duct (MD) appears (Aamar and Frank 2004). The MDs grow rostro-caudally, adjacent to the WD, until they join at the urogenital sinus (Kobayashi and Behringer 2003). At embryonic stage 13.5 days *post-coitum* (E13.5), the WDs and MDs which are respectively the anlagen of the male and female genital tracts, are both present in males and females (Jacob *et al.* 1999; Carroll *et al.* 2005). After sexual differentiation, the MDs regress in males and the WDs differentiate into male genital tract. In females, the mesonephric ducts regress and the MDs give rise to the oviducts, uterus, cervix and vagina.

#### Müllerian duct formation

The embryonic origin of the MDs has been a controversial issue for several years. Although they develop after pronephros resorption, it has nevertheless been suggested that the MDs were pronephretic derivatives. Indeed, some authors initially supported the idea that the anterior part of the oviducts was derived from fused nephrotomes remaining in the coelomic epithelium as small secondary ducts (Wrobel *et al.* 2002). However, it is now well established that MD formation is initiated in the cervical part of the intermediate mesoderm of the mammalian embryo (E11.75 in mice) by the invagination of the coelomic epithelium (Kobayashi

*et al.* 2004; Orvis and Behringer 2007), as illustrated in Fig. 1. The mechanism by which invaginating cells acquire an MD fate remains unclear, although *Wnt4* expression in the coelomic epithelium or the mesonephros seems to be necessary for MD initiation (Vainio *et al.* 1999). After initiation, the MDs elongate posteriorly, in close contact with the WDs, until they join at the urogenital sinus (Basile and De Michele 2001b). More precisely, a recent study from Orvis and Behringer, clearly showed that the Müllerian epithelium, at its most posterior end, is in physical contact with the Wolffian duct epithelium and is separated from the coelomic epithelium only by a basement membrane (Orvis and Behringer 2007). Based on genetic markers, the same study revealed that, in spite of its epithelial morphology, MD epithelium expresses mesenchymal markers and could thus be considered as a meso-epithelium tissue (like the coelomic epithelium which also expresses epithelial and mesenchymal markers) (Orvis and Behringer 2007). Furthermore, it has been demonstrated that WD experimental interruption leads to MD incomplete formation, highlighting the link between Wolffian and Müllerian ducts (Gruenwald 1941). More recent data have allowed to precise this information. Indeed, it seems that the first phase of MD development is WD-independent, whereas the close contact with the Wolffian duct is essential for Müllerian duct elongation (Vainio *et al.* 1999; Kobayashi *et al.* 2005; Orvis and Behringer 2007). The origin of Müllerian cells along the duct was still not clear until recently. Indeed, two hypotheses were proposed. The first one was in favour of Wolffian duct cells contribution to Müllerian duct formation (Balfour 1879), whereas the second supported that the WD just acted as a guide (Dohr *et al.* 1987b). Very recent data ruled out the hypothesis of the involvement of Wolffian duct cells as source of Müllerian duct epithelium (Dohr *et al.* 1987a; Guioli *et al.* 2007; Orvis and Behringer 2007). By lineage-tracing of

coelomic epithelium, in chick and mice explants, the authors showed that a discrete population of coelomic epithelium cells, probably located in the transition area between pronephros and mesonephros, segregates and gives rise to the entire anlagen of the Müllerian duct epithelium (Guioli *et al.* 2007). In addition, the origin of Müllerian ducts was corroborated by another approach using recombinant transplant cultures (Orvis and Behringer 2007). While no cell contribution from the Wolffian ducts is required for Müllerian duct formation, these cells play nevertheless a role in this process by sending paracrine signals (Carroll *et al.* 2005).

In addition to the demonstration of the origin of Müllerian duct cells, both groups of authors have described the cellular processes leading to MD elongation and mesenchyme formation (Guioli *et al.* 2007; Orvis and Behringer 2007): they showed that, in both chick and mouse, the full length Müllerian duct epithelium possesses BrdU and histone H3 positive cells, suggesting that the MDs can extend dependently of widespread cell proliferation along the developing duct. In addition, by removing the rostral part of the Müllerian duct on mesonephros explants, it has been demonstrated that the posterior tip cells of the duct are sufficient for laying the foundation of the forming Müllerian duct (Orvis and Behringer 2007). Concomitantly to Müllerian epithelium elongation, a spatial organization of mesenchyme surrounding cells takes place and physically separates the Wolffian and Müllerian ducts. The mechanism by which these surrounding mesenchymal cells get a Müllerian fate is still not clear. In fact, the Müllerian duct mesenchyme seems to derive from *in situ* mesonephros mesenchyme as well as local delamination of the coelomic epithelium cells situated along the length of the mesonephros (Guioli *et al.* 2007).

#### **Differentiation of the Müllerian duct**

The Wolffian and Müllerian ducts are discrete primordia which temporarily coexist in undifferentiated embryo until genetic sex triggers differentiation of either ovaries or testes. In males, MDs regress due to the sexual dimorphic expression of the anti-Müllerian hormone (AMH), also known as Müllerian-inhibiting substance (MIS), a member of the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) family, secreted by the Sertoli cells of the foetal testis (Josso *et al.* 1993). In addition, testosterone production by Leydig cells, allows androgen-dependant growth and differentiation of Wolffian ducts into epididymides, vas deferens and seminal vesicles (Hannema and Hughes 2007). In females, in absence of testicular hormones, Müllerian ducts differentiate into Fallopian tubes, uterus, cervix and upper part of the vagina while the Wolffian ducts degenerate (Jost 1953).

At the end of the elongation step, the growing tips of the MDs converge and join at the urogenital sinus (Orvis and Behringer 2007). The Müllerian tubules then fuse and form a one-luminal tube, the utero-vaginal duct, which will give rise to the upper vagina, cervix and uterus. The anterior non-fused region of the MD differentiates into oviducts and infundibulum. The morphology of mammalian uterus markedly varies between species, depending on the width of the ducts fusion. For instance, uterus is duplex in most rodents, generally bicornuate in big quadrupeds and simplex in most primates, including humans (Kobayashi and Behringer 2003). Although still controversial, it is generally admitted that the lower vagina is a derivative of the urogenital sinus. However its differentiation requires an induction mechanism by

the MD (Drews *et al.* 2002; Kobayashi *et al.* 2005). Data obtained from studies on human malformative syndromes clearly argue in that direction. Indeed, the Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome is a genetic disease that affects notably the development of inner genital tract (Basile and De Michele 2001a) (Morcel *et al.* 2007). These women lack Müllerian derivatives (uterus, upper vagina and optionally oviducts) but possess the lower part of the vagina, showing that upper and lower parts have different embryologic origins (Oppelt *et al.* 2005b). At birth, the female genital tract has undergone a regional morphologic specialisation that differentiates oviducts, uterus, cervix and upper vagina but it is still composed of simple structures that will acquire a full maturation aspect after birth and until puberty.

#### **Maturation of Müllerian ducts**

The MD maturation proceeds in three steps: 1) region specific Müllerian duct epithelium differentiation, 2) formation and organization of endometrium and myometrium, 3) uterine adenogenesis.

Firstly, the single-layered epithelium acquires different morphologies and cyto-architectures along its anterior-posterior axis. While the uterine epithelium is composed of simple columnar epithelial cells, the posterior cervix and the vaginal epithelia are made up with of stratified squamous cells and the oviducts epithelium possesses of ciliary and secretory cells. This process seems to occur perinatally since, at E16-18, the oviductal, uterine, cervical and Müllerian vaginal epithelial cells are morphologically undistinguishable (Komatsu and Fujita 1978; Kurita *et al.* 2001).

Distinct markers then appeared in mice at around 1-3 days *post-partum* (P1-3), and as regional patterning of epithelial differentiation takes place in the uterus, cervix and Müllerian vagina (Kurita *et al.* 2001). Oviductal epithelium ciliary cells differentiate at P5-10 and active secretory cells are observed from P23 (Komatsu and Fujita 1978). At the utero-vaginal level, the Müllerian duct epithelium undergoes these region-specific morphogenetic changes under mesenchymal cells paracrine influence (Cunha 1975;1976b;a). Indeed, heterotypic recombinant assays have demonstrated that uterine and Müllerian vaginal epithelia are both able to undergo either uterine or vaginal differentiation when induced by uterine or Müllerian vaginal mesenchyme, respectively. This characteristic is however stage-dependent: epithelial cells are the most responsive to mesenchyme signals at around P2-P5 but lose this competence by P9 (Cunha 1976b). At P10, only a subset of epithelial cells has kept some plasticity (Kurita *et al.* 2001). Uterine mesenchymal inductive activity has been shown in P2 up to P7 neonates whereas vaginal stroma keeps its inductive activity from 2 up to 150 days after birth (Cunha 1976b). Subsequently, in the developing uterus, like in many other organs (intestine, bladder, etc.), mesenchymal cells in close proximity to the epithelium differentiate into fibroblasts, to form the endometrium, whereas the most distant ones differentiate into smooth muscle, so forming the myometrium (Brody and Cunha 1989). It has been further demonstrated that myometrium differentiation and spatial organisation require the epithelium which can therefore be considered as a key mesenchymal inducer for endometrial/myometrial segregation and subsequent formation (Cunha *et al.* 1989; Cunha *et al.* 1992).

The female genital tract development ends with adenogenesis, *i.e.* the formation of uterine glands, which is the paroxysm of its functional differentiation. These glands are essential to later

survival and development of the conceptus by secreting histotrophic substances. Uterine adenogenesis involves differentiation and budding of glandular epithelium from luminal epithelium, penetration of uterine stroma by tubes of glandular epithelium and extensive branching and coiling of glandular epithelium (Gray *et al.* 2001). The timing of uterine adenogenesis is highly variable among mammalian species. In mice, it begins around P5 by epithelial invagination of glandular epithelium into the luminal epithelium (Brody and Cunha 1989); and completion is observed by P7 (Branham *et al.* 1985). This process seems to be governed by site-specific alterations in cell proliferation and movement, as well as by paracrine, cell-cell and cell-extracellular matrix interactions, and specific endocrine-, paracrine- and juxtacrine-acting factors and receptors (Gray *et al.* 2001).

### Molecular genetics of Müllerian duct development

Most of the genes known to be essential for MD embryonic development have been characterized either by description of Human syndromes affecting the female reproductive tract (FRT) formation, regression and differentiation or by studies of knocked-out mice (Table 1 and Fig. 2). Analysis of the molecular and cellular mechanisms of MD development depicts an emergent genetic cascade for this process (Kobayashi and Behringer 2003).

#### Early onset of Müllerian ducts

As aforementioned, the initial steps of MD formation in both sexes briefly consist in invagination of coelomic epithelium and caudal elongation towards the urogenital sinus. These two mechanisms depend on correct expression of various transcription

factors and signalling molecules. As previously described, the elongation phase, as well as further maintenance of MD, seems not only to depend on the intrinsic nature of the MD, but also to require the presence of WD (Roberts *et al.* 2002). As a consequence, genes involved in WD development are of critical importance for the subsequent onset of MD. Amongst factors required for FRT development, *Lim1* (a.k.a. *Lhx1*), *Pax2*, *Emx2*, *Wnt4*, *Wnt9b*, *Tcf2*, *Dach1* and *Dach2* seem to be essential for the initial biphasic process of MD formation and are therefore detailed below.

*Lim1*, a homeodomain-containing transcription factor, shows a dynamic expression pattern in the epithelium of the developing MD, beginning at E11.5 in the mouse. This suggests a role for *Lim1* in the very early steps of MD formation. Indeed, *Lim1*-null mutant mice display complete absence of mesonephric- and paramesonephric-derived structures, a phenotype consistent with the expression of the gene in the epithelium of both sexual ducts (Kobayashi *et al.* 2004). Furthermore, specific inactivation of *Lim1* in the WD epithelium, causing its degeneration, leads to impaired development of MD but does not affect their initial formation, highlighting the WD-dependent processes of MD elongation and maintenance but not initiation (Kobayashi *et al.* 2005). *Pax2*, a member of the *paired-box* gene family encoding transcription factors, is also expressed in the epithelium of the Wolffian and Müllerian ducts. This gene, involved in multiple developmental processes, appears to be essential for the development of the epithelial components derived from intermediate mesoderm. Indeed, *Pax2*-null mutant mice, which die perinatally due to absent kidneys, have neither Wolffian nor Müllerian derivatives (Torres *et al.* 1995). Nevertheless, unlike the phenotype observed in *Lim1*-null mutant mice, both sexual ducts initially form in *Pax2*-null

TABLE 1

### GENES INVOLVED IN THE DEVELOPMENT OF FEMALE GENITAL TRACT

Gene	Spatio-temporal expression of genes during FRT development			Phenotype in KO female mice	References
	Early <sup>1</sup>	Late <sup>2</sup>	Adult (sexual cycle)		
<i>Lim1</i>	CE, WE, ME	ME	NA	No FRT	Kobayashi, 2004
<i>Pax2</i>	CE, WE, ME	ME	Oviducts and proliferative epithelium	No FRT	Torres, 1995 Tong, 2007
<i>Emx2</i>	WE, ME	MMET	Endometrial development	No FRT	Myamoto, 1997
<i>Wnt4</i>	CE, MM	Restricted to uterine mesenchyme	Dynamic expression	No FRT	Vainio, 1999 Miller, 1998b
<i>Wnt5a</i>	MM, ME	MM	Dynamic expression	Defective posterior growth of MD. No uterine glands	Miller, 1998b Mericskay, 2004
<i>Wnt7a</i>	ME	ME	Dynamic expression	Posteriorization of genital tract. No uterine glands	Miller & Sassoon, 1998 Parr, 1998; Carta & Sassoon, 2004
<i>Wnt9b</i>	WE (*), NE in MD	WE (until E14.5), NE in MD	NE	Absent uterus and upper vagina	Carroll, 2005
RAR $\alpha, \beta, \gamma$	NA			Combined mutants: various degrees of affection	Mendelsohn, 1994
<i>Dlgh1</i>	WE (*)	NE	NA	Cervix and vagina aplasia	Iizuka-Kogo, 2007
$\beta$ -catenin	All compartments			Hypotrophic uterine horns + defective oviduct coiling. Myogenesis to adipogenesis switch (**)	Arango, 2005 Deutscher, 2007
<i>Hoxa10</i>	Colinear expression along the A/P axis		Steroid-dependent expression	Homeotic transformation of the anterior part of the uterus to an oviductal morphology	Benson, 1996
<i>Hoxa11</i>				Partial anteriorization: hypoplastic uterus, decreased endometrial glands.	Gendron, 1997
<i>Hoxa13</i> (***)				Agnesis of the caudal portion of MD.	Warot, 1997

MD: Müllerian duct; ME: Müllerian epithelium; WD: Wolffian duct; WE: Wolffian epithelium; CE: coelomic epithelium; MMET: Müllerian Mesenchyme-Epithelium Transition; FRT: Female Reproductive Tract; NA: not available; NE: not expressed.

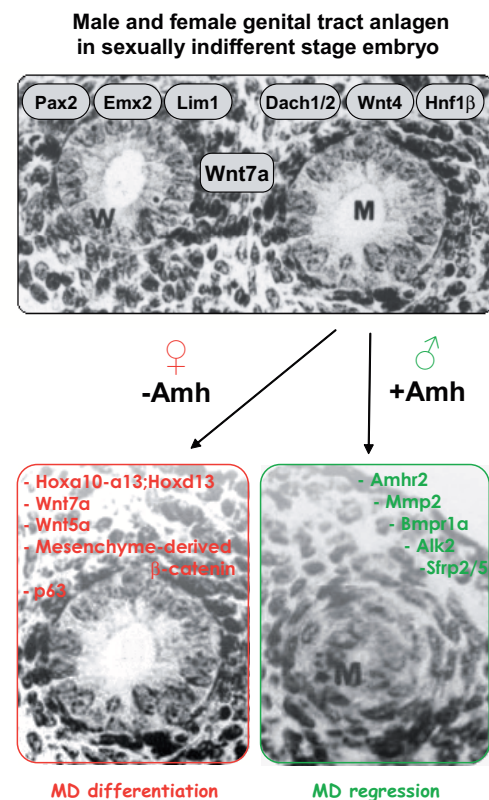
<sup>1</sup> Early refers to determination, invagination and elongation steps of MD. <sup>2</sup> Late corresponds to E13.5 (time of MD regression in the male) to puberty. \* Specific WD genes are indicated since MD growth initially depends on the presence of WD. \*\* Targeted knock-out, efficient from E15.5. \*\*\* Compound *Hoxa13*<sup>-/-</sup>; *Hoxd13*<sup>-/-</sup>-mutant females display severe urogenital and rectal anomalies (Warot, 1997) whereas *Hoxd13*<sup>-/-</sup>-mutant female are still fertile (Dollé *et al.* 1993).

embryos but degenerate soon after. In addition, the homeobox-containing gene *Emx2*, is expressed in the epithelial components of the urogenital system and plays a major role in the development of this organ. Similarly to *Pax2* mutants, both sexes of homozygous null mice for *Emx2* display complete absence of urogenital tract and die soon after birth (Miyamoto *et al.* 1997). Nevertheless, WD develops normally at E10.5 in these mice but degenerates the day after and, as expected, no MD is observed later. Finally, the POU domain-containing *TCF2* gene (formerly *v-HNF1* or *HNF-1beta*) has been shown to be expressed in many organs during development (Coffinier *et al.* 1999) and seems to play a general role in epithelial differentiation (Coffinier *et al.* 1999; Kolatsi-Joannou *et al.* 2001). Expression of this gene is particularly noticeable from the earliest steps of urogenital tract formation up to adult stage in the mouse model (Coffinier *et al.* 1999; Reber and Cereghini 2001). It was originally found associated with MODY-type diabetes (Horikawa *et al.* 1997) and with diabetes mellitus, renal cysts and other renal developmental disorders (Bingham *et al.* 2001; Kolatsi-Joannou *et al.* 2001). Interestingly, genital malformations such as bicornuate uterus (Bingham *et al.* 2002), uterus didelphys (Bingham *et al.* 2002) and Müllerian aplasia (Lindner *et al.* 1999) were also found together with renal anomalies in patients showing a defective gene, tending thus to show a major role of the *TCF2* gene during uro-genital development. Transcriptional co-factors such as *Dach1* and *-2* seem to also take place in the molecular cascade of MD formation. Whereas inactivation of each corresponding gene does not appear to affect this pathway, combined knock-out results in drastic defect of Müllerian derivatives, tending to show a functional redundancy of these factors (Davis *et al.* 2008).

In addition to the key role of the above homeodomain transcription factors in the early steps of MD formation, some signalling molecules have been shown to be involved in this process. Amongst them, *Wnt9b* and *Wnt4*, two members of the *Wnt* gene family encoding secreted glycoproteins, homologues to the *Drosophila* segment polarity gene *wingless*, are crucial paracrine factors. In mice, *Wnt9b* is expressed in the WD epithelium from E9.5 to E14.5 in both sexes and seems to be necessary for MD extension (Carroll *et al.* 2005). Interestingly, the phenotype of *Wnt9b* mutants can be rescued by activation of *Wnt1* within the WD, identifying the canonical Wnt pathway as a determinant signalling process in Müllerian ducts elongation. Another member of the family, *Wnt4*, is expressed in mesenchymal cells surrounding the newly formed MD on E12.5 in the mouse. *Wnt4*-null female mice exhibit a complete absence of FRT and, strikingly, are masculinised, probably due to ectopic activation of testosterone biosynthesis as initially hypothesized (Vainio *et al.* 1999; Heikkila *et al.* 2005). In fact, no Müllerian structures are observed both in male and female mutant mice on E11.5, before normal regression of MD takes place in the male. Thus, this reversal of sexual development in mutant female indicates a requirement for *Wnt4* in the initial steps of MD formation in both sexes but also for the suppression of male differentiation pathway in female gonad. Incidentally, a mutation in the *Wnt4* gene was discovered in a 46, XX woman presenting a somewhat similar phenotype: complete absence of MD-derived structures and clinical signs of androgens excess (Biason-Lauber *et al.* 2004). Interestingly, *Wnt4* and *Fgf9* seem to constitute mutual antagonistic signals in the bipotential gonad, regulating gonadal differentiation into female or male

pathway by imbalance between them (Kim *et al.* 2006).

Another well-studied signalling molecule in the context of embryonic development is retinoic acid (RA), a morphogen derived from vitamin A. RA seems to be particularly involved in antero-posterior patterning both along the body axis and in developing limb bud (Dreyer and Ellinger-Ziegelbauer 1996; Robert and Lallemand 2006). Compound null mutations of its cognate receptors (RARs and RXRs) lead to a broad range of developmental abnormalities, among which severe defects of the urogenital system (Mendelsohn *et al.* 1994). More precisely, *RARαβ2* double mutants lack identifiable MD in E12.5, a phenotype not imputable to a defect in WD formation, making RA signalling a specific pathway required to ensure the correct formation of MD. Similarly, abnormalities of the urinary and genital tracts have been recently described in *Dlgh1*-null mutant mice in both sexes (Iizuka-Kogo *et al.* 2007). The most interesting defect here is the aplasia of the uterine cervix and vagina due to defective lateral fusion and impaired caudal elongation of MD (Iizuka-Kogo *et al.* 2007). At the present time, no relation between retinoic acid and *Dlgh1* gene has been established. Finally, a



**Fig. 2. Genes involved in the regression or development of the Müllerian ducts.** At the so-called sexually indifferent stage (bipotential gonad), both male and female reproductive duct primordials co-exist. Sexual differentiation takes place according to the genetic sex of the embryo, determining its gonadal status and consequently allowing the differentiation into male or female reproductive organs. In female embryos, in the absence of specific male hormones, the WDs degenerate while the MDs ducts develop. In male embryos, the MDs degenerate and the WDs give rise to the male genital tract. Key genes involved in such processes are indicated on the figure.

requirement of PI3K/AKT signalling pathway for MD tip elongation has been uncovered (Fujino *et al.*, 2008), highlighting the intricacy of multiple signalling pathways for MD development.

#### **Regression of Müllerian ducts in the male**

As mentioned earlier, both male and female reproductive duct primordials coexist at the so-called sexually indifferent stage. Subsequently, sexual differentiation takes place according to the genetic sex of the embryo, determining its gonadal status and consequently allowing the differentiation into male or female reproductive organs. In female embryos, the absence of androgens seems to be sufficient to cause the degeneration of the WD, whereas regression of MD in male embryos is an active process mediated by AMH solely secreted by the foetal testis.

Molecular and cellular studies, mainly in the mouse, have shown that AMH exerts its effect on MD through a paracrine mechanism, by binding to its type II receptor (AMHRII). This latter is initially expressed in the coelomic epithelium of the mesonephros, prior to regression (Zhan *et al.* 2006). Binding of AMH to AMHRII induces the AMHRII-expressing cells to migrate into the area adjacent to the MD and eventually around the MD at ~E15.5, corresponding thus to an epithelial-to-mesenchymal transition. In the female, in absence of AMH, AMHRII expression remains located in the coelomic epithelium at least until stage E15.5 (Zhan *et al.* 2006). *Amh*- or *Amhrll*-mutant male mice show an identical phenotype: they exhibit a morphologically normal male reproductive system but are infertile because of the persistence of a complete FRT blocking sperm passage (Behringer *et al.* 1994; Mishina *et al.* 1996). Mutations in *AMH* or *AMHRII* genes have been reported in patients affected by Persistent Müllerian Duct Syndrome type I and type II respectively (Di Clemente and Belville 2006). These evidences tend to show that AMHRII is probably the unique receptor of type II mediating AMH signalling. In the mouse, *Bmpr1a* (a.k.a. *Alk3*) has been identified as a type I receptor, necessarily associated to *Amhrll* to mediate *Amh*-induced regression of Müllerian derivatives (Jamin *et al.* 2002). It is noteworthy that other Tgf- $\beta$  family type I receptors can transduce *Amh* signal in absence of *Bmpr1a* (Clarke *et al.* 2001; Jamin *et al.* 2003). Interestingly, *Alk2* (a.k.a. *Acvr1*) seems to mediate *Amh* signalling by inducing migration of *Amhrll*-expressing epithelial cells from the coelomic epithelium into the MD mesenchyme, accounting for the sexually dimorphic pattern of *Amhrll* expression during the regression (Zhan *et al.* 2006). According to their spatiotemporal expression pattern, *Alk2* and *Bmpr1a* type I receptors are thought to act sequentially in MD regression. Moreover, an epithelial-derived *Wnt7a* signal is required to induce or to maintain *Amhrll* expression in the Müllerian mesenchyme of both sexes, and thus responsiveness to *Amh* signalling. Indeed, *Wnt7a*-deficient mice do not express *Amhrll* in the ductal mesenchyme and are infertile due to persistent MD in the male and abnormal morphogenesis of the oviduct and uterus in the female (Parr *et al.* 1998; Parr and McMahon 1998). The direct effect of *Wnt7a* inactivation was corroborated by the description of  $\beta$ -catenin/Tcf4 complex binding onto *Amhrll* promoter to activate the gene (Hossain and Saunders 2003). These data highlight the multiple roles of *Wnt* signalling in the molecular cascades triggering sexual development. One of the earliest events following *Amh* signalling, but prior to MD regression seems to be *Sfrp2* and *-5* gene upregulation. However single or combined inactivation of either gene does not

lead to any overt anomaly of the reproductive tract development, suggesting that other members of the *Sfrp* gene family may redundantly be involved in this process (Cox *et al.* 2006).

Regression of MD is a cranial-to-caudal process achieved by both apoptosis of epithelial cells and epithelio-mesenchymal transition. A positive correlation has been found between the expression pattern of *Amhrll* and  $\beta$ -catenin cytoplasmic accumulation in the peri-Müllerian mesenchymal cells and seems to follow the wave of apoptosis spreading chronologically along the cranio-caudal axis (Allard *et al.* 2000). Furthermore,  $\beta$ -catenin co-localizes with *Lef1* (another member of the nuclear TCF/LEF family) in the nucleus of mesenchymal cells treated with *Amh*, and therefore might alter gene expression and cell fate, making  $\beta$ -catenin/*Lef1* complex a possible mediator of *Amh* action. Indeed, Allard and colleagues have observed that apoptosis of epithelial cells occurs only after disruption of the MD basement membrane and is followed by an entry of healthy epithelial cells into the mesenchymal compartment where they are subject to epithelio-mesenchymal transformation (Allard *et al.* 2000). One of the putative targets of *Amh* signalling is the Matrix metalloproteinase 2 gene (*Mmp2*). This gene is expressed in a sexually dimorphic pattern with an upregulation in the male Müllerian mesenchyme during regression; this male-specific expression pattern is lost in *Amh*-null mutant mice (Roberts *et al.* 2002). Additionally, inhibition of *Mmp2* protein activity blocks MD regression *in vitro* and is correlated with a decrease of apoptotic cells in the MD epithelium. Although *Mmp2*-null mutant mice develop a normal urogenital tract, probably due to redundancy with other gene (s) (Oppelt *et al.* 2005b), *Mmp2* remains a putative actor of *Amh*-induced regression (Itoh *et al.* 1997). More recently, Wilms' tumour suppressor gene (*Wt1*) has been described as another regulator of *Amhrll* expression (Klattig *et al.* 2007), providing a novel function for *Wt1* in the process of sexual development.

#### **Differentiation of Müllerian ducts**

In the female foetus, the differentiation of MD along the antero-posterior (A-P) axis depends on local inductive interactions between the MD epithelium and the surrounding mesenchyme. The correct regionalization of FRT, *i.e.* acquisition of tissue identity in cervix, uterus and vagina, relies on spatiotemporally regulated interactions between transcription factors and signalling molecules. Most of the genes acting to determine Müllerian cell fate and thus the proper MD identity are still expressed throughout differentiation. Amongst these genes, homeogenes such as *Hox* genes play a crucial role in specifying cell characteristics along the A-P axis.

The homeobox (*Hox*) genes belong to a large family of 39 genes organized in four clusters, *Hoxa* to *Hoxd* (*HOXA-D* in Human), each on a different chromosome. These major developmental genes are involved in patterning the animal body axis by providing positional identity through the molecular "Hox code", emerging from highly complex spatiotemporal combinations of *Hox* proteins (Hombria and Lovegrove 2003). Some members of the *Abdominal-B* (*Abd-B*) like *Hox* gene family, *Abd-B Hoxa9* to *13* and *Hoxd9* to *13*, are expressed in partially nested patterns in the mesenchyme of the developing MD, defining a specific *Hox* code along the A-P axis (Dollé *et al.* 1991; Taylor *et al.* 1997). Evidence of their roles was provided, particularly by *in vivo* inactivation of *Hoxa10*, *Hoxa11*, *Hoxa13* and *Hoxd13* genes in the mouse, that



led to region-specific alterations of the reproductive tract. *Hoxa10*-null mutant mice exhibit abnormal utero-tubular junction and uterine epithelium and an anterior homeotic transformation of the upper part of the uterus into oviduct-like structure (Benson *et al.* 1996). In *Hoxa11*-deficient mice, the uterus is thinner and shorter than normal and endometrial glands have not developed, suggesting an anteriorized phenotype (Gendron *et al.* 1997). Moreover, replacement of the homeodomain of *Hoxa11* by that of *Hoxa13* results in a posterior homeotic transformation of the uterus into cervix- and vagina-like structures (Zhao and Potter 2001). Besides, *Hoxa13*-null mice show agenesis of the distal portion of the MD, indicating a role for *Hoxa13* not only in the differentiation but also in the formation of MD (Warot *et al.* 1997). Subsequently, mutations in the *HOXA13* coding region have been shown to cause Hand-foot-genital syndrome (HFGS) in Human, characterized by hands and feet defects, hypospadias in males, Müllerian duct fusion defect in females and urinary tract malformations in both sexes (Mortlock and Innis 1997; Goodman *et al.* 2000).

Despite its involvement during MD regression in the male, *Wnt7a* is also required for correct patterning of the murine FRT. Initially expressed throughout the MD epithelium, *Wnt7a* expression becomes postnatally restricted to the oviductal and uterine epithelium, declining in the vaginal epithelium (Miller *et al.* 1998b). Loss of *Wnt7a* expression in the differentiating MD results in partial homeotic transformation of the oviduct to uterus and of the uterus to vagina (Miller and Sassoon 1998). Since *Wnt7a* is not required to induce *Hoxa* gene maintenance, *Wnt7a* and *Hoxa* genes are likely acting in parallel pathways during FRT development. Indeed, a combinatorial regulation by *Hox* and *Wnt* genes probably occurs in most organogenesis and therefore during FRT development (for a review, see Bondos 2006). Moreover, *Wnt7a* mutant uterus in adult presents an atrophic aspect due to postnatal uterine growth failure, a phenotype partly related to the role of *Wnt7a* as a suppressor of cell death in the FRT (Carta and Sassoon 2004). In addition, the absence of oviduct coiling in the *Wnt7a*-null mice has been reproduced by specific inactivation of  $\beta$ -catenin in the MD mesenchyme using an *Amhr2-cre* mouse line, without any observed alteration in *Wnt5a* and *Wnt7a* expression patterns (Deutscher and Hung-Chang Yao 2007). This defect on oviduct differentiation is accompanied by an overall hypotrophic aspect of uterine horns, a phenotype correlated with a decreasing cell proliferation in both the epithelium and the mesenchyme of the Müllerian derivatives. In the end, deletion of  $\beta$ -catenin directed by the *Amhr2-cre* transgene leads to adipose tissue deposition in the uterine wall in adult, probably due to cell fate switch from myogenesis to adipogenesis (Arango *et al.* 2005; Deutscher and Hung-Chang Yao 2007), without any ovarian phenotype. Nevertheless, recent *in vitro* studies have uncovered the requirement of  $\beta$ -catenin for normal ovarian steroidogenesis (Hernandez-Gifford *et al.* 2009).

Given the specific expression of *Wnt7a* in the luminal epithelium of the uterus (Miller *et al.* 1998b), the phenotype of *Wnt7a*-null mutant mice implies crucial paracrine interactions between uterine epithelium and stromal cells. *Wnt5a*, a component of the non-canonical Wnt signalling pathway, that is expressed in mesenchyme of the uterus, cervix and vagina (Miller *et al.* 1998b), is an actor of such interactions. Indeed, *Wnt5a* is required for proper development of the posterior region of FRT and for uterine

adenogenesis (Mericskay *et al.* 2004). Therefore, involvement of *Wnt7a* and *Wnt5a* for glandular genesis in the uterus highlights the necessary cooperation between epithelium- and stroma-derived signals during the essential process of cyto-differentiation. In this context of reciprocal interactions, *p63*, a homologue of *p53* tumour suppressor gene, is considered as an identity switch for MD epithelial differentiation into uterine or cervicovaginal cell fate (Ince *et al.* 2002; Kurita *et al.* 2004). Besides, the homeodomain transcription factor *Msx2*, promotes normal vaginal epithelial differentiation and, interestingly, seems to be involved in regression of the caudal region of WD in females by promoting apoptosis (Yin *et al.* 2006).

In conclusion, differentiation of MD into a functional reproductive tract relies on a complex genetic cascade wherein cooperation between *Wnt* and *Hox* genes is fundamental for correct patterning and maturation of the FRT. It is noteworthy that many of the developmental genes presented above, especially *Hox* genes, are also regulated by steroid hormones during both embryogenesis and adulthood (Daftary and Taylor 2006). The role of this endocrine regulation in the reproductive tract is now well established during embryonic development but appears to be also essential in adult developmental-like processes such as menstrual cycle, embryo implantation and pregnancy.

Studying the consequences of prenatal or perinatal exposure to endocrine disruptors such as diethylstilbestrol (DES) gives new insights on hormonal regulation of these genes during critical periods of FRT development and may be useful to address the question of epigenetic regulations of *Hox* genes, an extensively studied research field in recent years.

## What about epigenetics?

### *Epigenetics and environment*

The term epigenetics refers to the overall molecular phenomenon which is heritable from parents and that regulates gene expression without any alteration of the genomic DNA sequence. These heritable epigenetic changes include DNA methylation, post-translational modifications of histones tails (acetylation, methylation, phosphorylation,...) and chromatin remodelling. The epigenome is the set of epigenetic prints present in a given genome, at a given time and in a given cell type.

Most of the studies on epigenetic regulation have shown that environment can play an important role in this respect. Indeed, both environmental chemicals and toxins have recently been shown to alter DNA methylation patterns, resulting in epigenetic phenotypes (Cisneros 2004; Anway *et al.* 2005).

Several studies have shown that, during critical periods of differentiation, exposure to low environmentally relevant doses of some chemicals, may alter developmental programming. In particular, two studies demonstrated that xenobiotic chemicals such as tributyltin present in PVC plastics as well as some fungicides, alter normal development and homeostatic control over adipogenesis and energy balance, leading to obesity (Grun and Blumberg 2006; Tabb and Blumberg 2006). Moreover, recent works on mice by Newbold and collaborators, support the idea that a brief exposure to environmental chemicals, especially those with estrogenic activity, can increase body weight in correlation with age (Newbold *et al.* 2007b; Newbold *et al.* 2007c). Precisely, treatment of females with diethylstilbestrol does not

affect the body weight during the time of exposure, but provokes, later on, an increase of the body weight associated with an augmentation of body fat. In addition, exposure of adult animals to metals such as cadmium or nickel, has been associated with tumorigenesis. In fact, these metals seem to interact with the epigenome and induce carcinogenic effects through abnormal DNA methylation (Salnikow and Costa 2000; Poirier and Vlasova 2002).

Among harmful chemicals, the so-called endocrine disruptors have been described to present strong effects on the development of organisms. Indeed, various natural or synthetic molecules can interfere with the endocrine system through the binding to members of the intracellular steroid receptors family. This interference ultimately disturbs the normal function of tissues and organs, in particular those of the reproductive tract. Exposure to endocrine-disrupting chemicals present in the environment has been reported to cause many disorders in mammals like abnormal thyroid and immune function, alteration of the developing reproductive tract such as de-masculinization and feminization of males, associated with decreasing fertility. These adverse effects were reported for multiple chemicals such as industrial waste and pesticides (reviewed in Colborn *et al.* 1993).

Recently, several lines of evidence have tended to show that epigenetic adaptations, in response to *in utero* nutritional and environmental factors, play an important role in developmental plasticity and diseases susceptibility. Waterland and collaborators have demonstrated that the epigenetic gene regulation of the imprinted gene *Igf2* may be influenced by early post-natal nutritional diet in the mouse model. Indeed, in normal environmental conditions, the *Igf2* gene is expressed from the paternal allele whereas the maternal gene is repressed by imprinted silencing. When a methyl-donor deficient diet is administered to animals for 60 days post-weaning, a paternal hypomethylation of the gene is observed, in correlation with a significant loss of imprinted regulation of the *Igf2* gene (Waterland *et al.* 2006). Therefore, nutrition may alter the epigenome of these young animals (Waterland *et al.* 2006).

Besides experimentally diet-mediated imprinting, general environment conditions may also lead to epigenetic variations in humans. As another evidence of environment modification of the epigenome, is the following study of Fraga and collaborators (Fraga *et al.* 2005). From a set of monozygotic twins of various ages and living in different environments, an epigenetic profile of each person was performed by measuring the global CpG methylation and the acetylation on H3 and H4 histones. This showed that, although twins are epigenetically indistinguishable during the early years of life, older twins exhibit remarkable differences in their overall content and genomic distribution of DNA methylation and histone acetylation, which can thus bring variations in each subject's gene expression pattern. Furthermore, these data clearly showed a more important difference of the epigenome between older twins and between twins who have lived separately more than 50% of their lifetime (Fraga *et al.* 2005).

Epigenetic modifications can therefore be induced by natural and synthetic chemicals present in the environment. These epigenetic changes seem to lead to some genetic programs variations and consequently may have drastic effects on human development and health. Amongst organs that can be affected by these compounds, the reproductive tract is a very sensitive target.

The following paragraphs will address the developmental alterations of the reproductive tract, which can be triggered by natural and synthetic epigenetic effectors.

### **Effects of estrogens on female reproductive tract development**

As mentioned earlier, the development of the female reproductive tract (FRT) is regulated by steroid hormones and in particular by oestrogens acting through two different receptors, designated ER $\alpha$  and ER $\beta$ . ER $\alpha$  is predominantly expressed in the uterus, vagina, mammary gland, and thecal cells of the ovary whereas ER $\beta$  is mainly expressed in the granulosa cells of the ovary (Couse and Korach 1999; Muramatsu and Inoue 2000). The particular role of ER $\alpha$  in FRT development has been revealed by disrupting the corresponding gene in the mouse, driving to hypoplastic uterine and vaginal tissues (Couse and Korach 1999; Hewitt and Korach 2002).

The molecular mechanism triggered by steroid hormones is relatively well known. Indeed, the steroid hormones linked to specific nuclear receptors which are able to bind to the promoter of target genes and then regulate proliferation and/or differentiation processes (Groothuis *et al.* 2007). Considering the importance of steroid hormones in FRT development, exposure to endocrine disruptors may thus have a strong impact on this organ system. As a matter of fact, aberrant temporal or over stimulation of oestrogens signalling pathway during development is now known to lead to various long-term or irreversible abnormalities (Newbold *et al.* 1990). During the last decades, large quantities of various chemicals with oestrogenic activity have been released into the environment. Many of them can potentially influence the endocrine system and therefore modify organs responsiveness to endocrine signals during pre- and/or post-natal life, by disrupting the proper expression of oestrogen-regulated genes.

Amongst these compounds, genistein, a nonsteroidal phytoestrogen, is present in food, particularly in soy products. Human foetuses may thus be exposed to this molecule during *in utero* development as well as in infancy through lactation. Newbold and colleagues have demonstrated that neonatal exposure of mice to genistein leads to an increase of uterine adenocarcinoma later in life (Newbold *et al.* 2001). Moreover, this phytoestrogen can exert dose-dependent adverse effects on the ovary: neonatal exposure to genistein at environmentally relevant doses alters ovarian differentiation and development, and leads to multioccyte follicles still visible later in life; at a higher dosage, females become infertile (Jefferson *et al.* 2002). In addition, at lower doses, females show minor rates of pregnancy coupled with smaller and fewer implantation sites (Jefferson *et al.* 2002).

Bisphenol A (BPA) is a synthetic compound used in the manufacture of many plastics including food containers and dental composites. This molecule presents an oestrogenic activity and as such, is able to induce malformations of the FRT. Indeed, recent experimental studies on mice have highlighted the association of BPA with deformity of the reproductive tract and with gynaecologic cancers. In particular, it has been reported that exposure to BPA leads to earlier vaginal opening (Honma *et al.* 2002), to altered ovarian morphology (Markey *et al.* 2003; Kim *et al.*, 2009), to proliferative lesions of the uterus (Newbold *et al.* 2007a) and to a strong incidence of cystic ovaries (Newbold *et al.* 2007a).

The most dramatic report on FRT malformations induced by a

synthetic nonsteroidal estrogen-mimetic molecule, is the abnormalities observed in women exposed *in utero* to DES. Although, this chemical had been demonstrated to be ineffective as soon as 1953 (Dieckmann *et al.* 1953), it was prescribed for miscarriage and other pregnancy complications between 1938 and 1971. Several studies have demonstrated that prenatal exposure of female to DES was associated with subsequent development of reproductive tract abnormalities. First, women prenatally exposed to DES presented with a "T shaped" uterus and an increased incidence of clear cell adenocarcinomas of the vagina and cervix. Second, these women also presented an enhanced risk of spontaneous abortion, ectopic pregnancy and preterm delivery (Kaufman *et al.* 2000). These epidemiologic studies were corroborated by experimental studies performed on mice exposed to DES during development. Indeed, these mice showed many malformations of the uterus, characterized by squamous metaplasia of the luminal and glandular epithelium, and by endometrial hyperplasia and increased risk of leiomyomas (Kitajewski and Sassoon 2000). In addition, these mice showed persistent epithelium cornification of the vagina associated with adenocarcinoma, and oviduct proliferative lesions (Mclachlan *et al.* 1980; Couse *et al.* 2001; Couse and Korach 2004).

The overall data cited above demonstrate clearly that natural or synthetic compounds, with oestrogenic activity, can have adverse effects on the FRT and consequently disrupt reproductive functions. Moreover, the detrimental effects of steroid disruptors are generally not visible before the offspring reaches maturity or even middle age. Such molecules have been shown to have long time effects on the female mouse or woman reproduction. Indeed epidemiologic and experimental studies have pointed out that developmental alterations of the reproductive tract could be inherited to the next generation, suggesting that DES exposure could affect durably gene regulation. However, the molecular mechanisms involved in such inheritance of altered genetic traits are far to be clearly understood.

#### Effects of DES on developmental genes

As a first step to understand the molecular mechanisms involved in the alteration of the female reproductive tract exposed to DES, target genes for such molecules need to be clearly identified. Amongst these genes, the *Hoxa* genes are under control of both oestrogen and progesterone (Ma *et al.* 1998). Moreover, the phenotype associated with developmentally experimental exposure to DES is similar to those observed in *Hoxa* genes knocked out mice. In fact, DES-induced abnormalities include loss of the boundary between the oviduct and the uterus, associated with a loss of uterotubal junction, a phenotype also present in *Hoxa-10* mutant mice. Ma and collaborators have demonstrated that expression of *Hoxa9*, *Hoxa10* and *Hoxa11* is repressed by DES in the mouse developing reproductive ducts following foetal or neonatal exposure to DES (Ma *et al.* 1998). This repression of *Hoxa* genes provides a putative explanation to the teratogenic effects of DES on the developing FRT. Other features of DES exposure, *i.e.* vaginal adenosis, abnormal urethral openings in the vagina and failure of distal MD to form a common cervical canal, correlate with those of the *Hoxa-13* mutant mice. In order to further correlate DES exposure and *Hoxa* genes expression, Block and collaborators, have treated mice with DES from days 9 to 16 of gestation (Block *et al.* 2000). Using *in situ* hybridization experiments, they revealed a

posterior shift of *Hoxa9* and *Hoxa10* expression in the reproductive tract of female offspring. A similar decrease was observed in the *Hoxa11* anterior expression domain. In this study, the authors suggested that the DES-induced homeotic transformations of the reproductive tract could correspond to the uterine morphological changes seen in up to 70% of the women exposed *in utero* to DES ("T-shaped" uterus). In fact, the decrease of *Hoxa10* and *Hoxa11* expression and the increase of *Hoxa9* expression may cause the uterus to develop in the tissue normally fated by *Hoxa9* *i.e.* the oviduct. The T-shape of the uterus in DES-exposed women, may then stand for a transformation into an oviduct-like structure (Block *et al.* 2000).

In addition to these studies on *Hox* genes, other investigations have shown that DES is acting through multiple gene pathways to cause structural changes in the FRT. For instance, DES *in utero* exposure leads to a down-regulation of the *Wnt7a* gene in the foetal uterus up to birth; normal regulation of the gene is only restored 5 days after birth (Miller *et al.* 1998a). Interestingly, prenatally DES-exposed mice and *Wnt7a*<sup>-/-</sup> mutants show similar deformity of the FRT. One hypothesis to explain this, would be that the DES-induced transient down-regulation of *Wnt7a* during a critical window of time, is sufficient to account for the DES syndrome. During the down-regulation of the *Wnt7a* gene, the female reproductive tract would lose the competency to respond appropriately to surrounding signals. This hypothesis is consistent with grafting experiments showing that vaginal and uterine epithelia are responsive to stromal induction when grafting is performed between P3 to P5. It is noteworthy that epithelia are no more responsive when the experiment is performed at later stages (Cunha 1976b).

The expression of the developmental gene *Msx2* has also been described to be altered in the female reproductive tract following foetal exposure to DES. Indeed, *Msx2* is involved in vaginal epithelial differentiation and is required for Tgf- $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 expression in the reproductive tract (Yin *et al.* 2006). In mice, after exposure to DES, the level of *Msx2* transcripts is significantly lower than physiological level in the developing uterus (Huang *et al.* 2005) and in vaginal epithelium (Yin *et al.* 2006). Moreover, a much more severe DES-induced vaginal phenotype is observed in *Msx2*<sup>-/-</sup> mutant mice exposed to DES, suggesting an important role for this gene during the estrogen-dependent growth of Müllerian derivatives and therefore in the protection of adverse effects of DES (Yin *et al.* 2006). However this protective mechanism remains unknown.

Many developmental genes involved in organogenesis of the FRT have been shown to be deregulated following *in utero* or neonatal exposure to the pharmacological endocrine disruptor DES. In spite of this, the mechanism by which these deregulations would be transmitted through generations is completely unclear. Indeed, no alteration of genomic DNA methylation pattern has been described yet under this condition. In particular, no variation in the methylation pattern of *Hoxa10* and *Hoxa11* promoters was observed in the mouse uterus after neonatal DES exposure (Li *et al.* 2001a). This transmission of phenotypic traits without alteration of methylation marks on DES-regulated genes is thus extremely puzzling and needs to be clarified.

#### DES and epigenetics

During more than 30 years, DES was heavily prescribed to pregnant women to prevent miscarriages and other pregnancy

problems. Much later, correlation between this chemical compound and reproductive dysfunctions was uncovered. Epidemiologic studies revealed that structural uterine, cervical or vaginal abnormalities may be as high as 33% in women with *in utero* exposure and that overall pregnancy outcomes in DES-exposed women were worse than those in unexposed women (Kaufman *et al.* 2000). Moreover, a small cell ovarian carcinoma was found in a 15 year old girl whose maternal grand mother was treated by DES during her pregnancy (Blatt *et al.* 2003).

This observation was later established in the mouse, in experiments aiming at understanding genetic and epigenetic mechanisms involved in both adverse and transgenerational effects of DES exposure. Overall outcomes showed that foetal exposure to DES led to poor reproductive outcome and to gynaecologic tumours later on. Furthermore, it appeared that the adverse effects of DES, such as tumour susceptibility, could be transmitted to subsequent generation (s) of both males and females. More precisely, experiments dealt with mice exposed to DES during various stages of gestation and with F1 and F2 females mated to unexposed males. It first appeared that F2 females' fertility was not affected unlike F1's. However F2 mice showed a high frequency of tumours, about similar to that assessed in F1 (Walker and Haven 1997). This study was further corroborated although F2 females exhibited a tumour incidence (including uterine adenocarcinoma) higher than controls but lower than F1 mice (Newbold *et al.* 1998).

The transmission of specific lesions of the female reproductive tract, such as uterine adenocarcinoma, to subsequent generation(s) seems to be difficult to explain without evoking epigenetic mechanisms. While no epigenetic modification was detected on key developmental genes such as *Hoxa* genes (Li *et al.* 2001b), modifications of DNA methylation have been reported for other genes following exposure to DES (Newbold *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2008). For example the estrogen-responsive lactoferrin gene seems to be up-regulated in the mouse uterus, after neonatal exposure to DES; this abnormal expression persists later in life (Nelson *et al.* 1994) and may be attributed to an abnormal demethylation in the lactoferrin gene promoter, which seems to occur specifically in response to neonatal DES exposure (Li *et al.* 1997). Moreover, this demethylation state is continuously maintained in uterine tumours of DES-exposed mice, suggesting that neonatal DES treatment may not only induce tumour formation but also gene-specific demethylation, through a common cellular process, such as alterations of the expression of DNA methyltransferases and methylation of genomic DNA (Li *et al.* 1997; Sato *et al.* 2009). Subsequent work demonstrated that other developmental genes, up-regulated after exposure to DES, also exhibit modified methylation patterns. As such, the proto-oncogene *c-fos* is one of the early and persistently induced genes in uterine epithelium of mice exposed to oestrogen stimulation (Loose-Mitchell *et al.* 1988). Moreover this gene is known to play an important role in uterine epithelial proliferation and in uterine tumorigenesis. As a matter of fact, the yield of unmethylated CpGs in the exon-4 of this gene, is higher in neonatally DES-exposed mice than in untreated controls (Li *et al.* 2003). Although, the consequences of the hypomethylation level of these two genes remain unclear, it has been proposed that methylation pattern of genomic DNA can be transmitted to subsequent generation (s) (Holliday 1990). The fact that F2 mice, which were not

directly exposed to DES, develop uterine adenocarcinoma would thus be explained by the transmission of modified methylation pattern of genes involved in cell homeostasis such as the proto-oncogene *c-fos*. In addition, we previously mentioned, that genistein was a compound presenting an oestrogenic activity, and able to induce formation of multiocyte follicles on DES-treated neonates (Jefferson *et al.* 2002). Interestingly, a complementary study showed that F2 female mice also present multiocyte follicles although they were not formerly exposed to genistein (Jefferson *et al.* 2007).

The transmission of epigenetic pattern has been difficult to accept for many scientists until recently. Indeed, for several years, it was thought that methylation prints were removed from DNA as it was packaged into germ cells, wiping the epigenetic state clean for next generation. The whole literature on DES, as well as other studies performed by Cropley and collaborators, strengthen the relevance of a transmission of the epigenome through following generations (Cropley *et al.* 2006). Indeed, these authors showed that feeding pregnant *A<sup>vy</sup>/a* mice with methyl donor in their diet not only shifted the coat colours of their offspring towards the brown end of the spectrum (Wolff *et al.* 1998), but also affected the next generation in the same way, showing that the grandmother's diet can affect the epigenetic state of her grandchildren (Cropley *et al.* 2006) through a stable modification of the germline epigenetic state (Cropley *et al.* 2007).

## Conclusion

The venue of epigenetic research has allowed scientists to interpret some inexplicable malformative pathologies or environmental induced diseases such as cancers or allergies. Indeed, epigenetics could explain not only the discordances observed between monozygous twins but also phenomena such as incomplete penetrance, variable expression, sporadic cases and provide a novel viewpoint for understanding normal and aberrant development. The study of epigenetic mechanisms involved in such normal and pathologic processes constitutes thus a new exciting approach of investigation. In addition, considering that most epigenetic alterations are reversible both *in vitro* and *in vivo*, it suggests that a new therapy targeting complexes that catalyse epigenetic modifications could be found in the future.

## Acknowledgments

*IP wishes to sincerely thank Dr. F. Omilli for helpful comments on the manuscript; Agnes Burel for technical assistance. JM was supported by a grant from the "Conseil Régional de Bretagne" and TW was supported by a French Ministry fellowship. This work was supported by the CNRS and by grants from "Rennes Métropole" and the "Conseil Régional de Bretagne".*

## References

- AAMAR, E. and FRANK D. (2004). *Xenopus* Meis3 protein forms a hindbrain-inducing center by activating FGF/MAP kinase and PCP pathways. *Development* 131: 153-163.
- ALLARD, S., ADIN P., GOUEDARD L., DI CLEMENTE N., JOSSO N., ORGEBIN-CRIST M.C., PICARD J.Y. and XAVIER F. (2000). Molecular mechanisms of hormone-mediated Mullerian duct regression: involvement of beta-catenin. *Development* 127: 3349-3360.
- ANWAY, M.D., CUPP A.S., UZUMCU M. and SKINNER M.K. (2005). Epigenetic

- transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308: 1466-1469.
- ARANGO, N.A., SZOTEK P.P., MANGANARO T.F., OLIVA E., DONAHOE P.K. and TEIXEIRA J. (2005). Conditional deletion of beta-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev Biol* 288: 276-283.
- BALFOUR, F.M., SEDGEWICK, A. (1879). On the existence of a head-kidney in the embryo chick, and on certain points in the development of Müllerian duct. *K.J. Microsc. Sci.* 19: 1-19.
- BASILE, C. and DE MICHELE V. (2001a). Renal abnormalities in Mayer-Rokitanski-Kuster-Hauser syndrome. *J Nephrol* 14: 316-318.
- BASILE, C. and DE MICHELE V. (2001b). Renal abnormalities in Mayer-Rokitanski-Kuster-Hauser syndrome. *J Nephrol* 14: 316-318.
- BEHRINGER, R.R., FINEGOLD M.J. and CATE R.L. (1994). Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79: 415-425.
- BENSON, G.V., LIM H., PARIJA B.C., SATOKATA I., DEY S.K. and MAAS R.L. (1996). Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* 122: 2687-2696.
- BIASON-LAUBER, A., KONRAD D., NAVRATIL F. and SCHOENLE E.J. (2004). A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med* 351: 792-798.
- BINGHAM, C., BULMAN M.P., ELLARD S., ALLEN L.I., LIPKIN G.W., HOFF W.G., WOOLF A.S., RIZZONI G., NOVELLI G., NICHOLLS A.J. and HATTERSLEY A.T. (2001). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene are associated with familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease. *Am J Hum Genet* 68: 219-224.
- BINGHAM, C., ELLARD S., COLE T.R., JONES K.E., ALLEN L.I., GOODSHIP J.A., GOODSHIP T.H., BAKALINOVA-PUGH D., RUSSELL G.I., WOOLF A.S., NICHOLLS A.J. and HATTERSLEY A.T. (2002). Solitary functioning kidney and diverse genital tract malformations associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Kidney Int* 61: 1243-1251.
- BLATT, J., VAN LE L., WEINER T. and SAILER S. (2003). Ovarian carcinoma in an adolescent with transgenerational exposure to diethylstilbestrol. *J Pediatr Hematol Oncol* 25: 635-636.
- BLOCK, K., KARDANA A., IGARASHI P. and TAYLOR H.S. (2000). In utero diethylstilbestrol (DES) exposure alters Hox gene expression in the developing mullerian system. *FASEB J* 14: 1101-1108.
- BONDOS, S. (2006). Variations on a theme: Hox and Wnt combinatorial regulation during animal development. *Sci STKE* 2006: pe38.
- BOUCHARD, M., SOUABNI A., MANDLER M., NEUBUSER A. and BUSSLINGER M. (2002). Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes Dev* 16: 2958-2990.
- BRANHAM, W.S., SHEEHAN D.M., ZEHR D.R., RIDLON E. and NELSON C.J. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 beta-estradiol. *Endocrinology* 117: 2229-2237.
- BRODY, J.R. and CUNHA G.R. (1989). Histologic, morphometric, and immunocytochemical analysis of myometrial development in rats and mice: I. Normal development. *Am J Anat* 186: 1-20.
- CARROLL, T.J., PARK J.S., HAYASHI S., MAJUMDAR A. and MCMAHON A.P. (2005). Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell* 9: 283-292.
- CARTA, L. and SASSOON D. (2004). Wnt7a is a suppressor of cell death in the female reproductive tract and is required for postnatal and estrogen-mediated growth. *Biol Reprod* 71: 444-454.
- CISNEROS, F.J. (2004). DNA methylation and male infertility. *Front Biosci* 9: 1189-1200.
- CLARKE, T.R., HOSHIYA Y., YI S.E., LIU X., LYONS K.M. and DONAHOE P.K. (2001). Mullerian inhibiting substance signaling uses a bone morphogenetic protein (BMP)-like pathway mediated by ALK2 and induces SMAD6 expression. *Mol Endocrinol* 15: 946-959.
- COFFINIER, C., BARRA J., BABINET C. and YANIV M. (1999). Expression of the vHNF1/HNF1beta homeoprotein gene during mouse organogenesis. *Mech Dev* 89: 211-213.
- COLBORN, T., VOM SAAL F.S. and SOTO A.M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101: 378-384.
- COUSE, J.F., DIXON D., YATES M., MOORE A.B., MA L., MAAS R. and KORACH K.S. (2001). Estrogen receptor-alpha knockout mice exhibit resistance to the developmental effects of neonatal diethylstilbestrol exposure on the female reproductive tract. *Dev Biol* 238: 224-238.
- COUSE, J.F. and KORACH K.S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20: 358-417.
- COUSE, J.F. and KORACH K.S. (2004). Estrogen receptor-alpha mediates the detrimental effects of neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure in the murine reproductive tract. *Toxicology* 205: 55-63.
- COX, S., SMITH L., BOGANI D., CHEESEMAN M., SIGGERS P. and GREENFIELD A. (2006). Sexually dimorphic expression of secreted frizzled-related (SFRP) genes in the developing mouse Mullerian duct. *Mol Reprod Dev* 73: 1008-1016.
- CROPLEY, J.E., SUTER C.M., BECKMAN K.B. and MARTIND.I. (2006). Germ-line epigenetic modification of the murine A vy allele by nutritional supplementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17308-17312.
- CROPLEY, J.E., SUTER C.M. and MARTIN D.I. (2007). Methyl donors change the germline epigenetic state of the A (vy) allele. *FASEB J* 21: 3021; author reply 3021-302.
- CUNHA, G.R. (1975). The dual origin of vaginal epithelium. *Am J Anat* 143: 387-392.
- CUNHA, G.R. (1976a). Epithelial-stromal interactions in development of the urogenital tract. *Int Rev Cytol* 47: 137-194.
- CUNHA, G.R. (1976b). Stromal induction and specification of morphogenesis and cytodifferentiation of the epithelia of the Mullerian ducts and urogenital sinus during development of the uterus and vagina in mice. *J Exp Zool* 196: 361-370.
- CUNHA, G.R., BATTLE E., YOUNG P., BRODY J., DONJACOUR A., HAYASHI N. and KINBARA H. (1992). Role of epithelial-mesenchymal interactions in the differentiation and spatial organization of visceral smooth muscle. *Epithelial Cell Biol* 1: 76-83.
- CUNHA, G.R., YOUNG P. and BRODY J.R. (1989). Role of uterine epithelium in the development of myometrial smooth muscle cells. *Biol Reprod* 40: 861-871.
- DAFTARY, G.S. and TAYLOR H.S. (2006). Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr Rev* 27: 331-355.
- DAVIS, R.J., HARDING M., MOAYEDI Y. and MARDON G. (2008). Mouse Dach1 and Dach2 are redundantly required for Mullerian duct development. *Genesis* 46: 205-213.
- DEUTSCHER, E. and HUNG-CHANG YAO H. (2007). Essential roles of mesenchyme-derived beta-catenin in mouse Mullerian duct morphogenesis. *Dev Biol* 307: 227-236.
- DI CLEMENTE, N. and BELVILLE C. (2006). Anti-Mullerian hormone receptor defect. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20: 599-610.
- DIECKMANN, W.J., DAVIS M.E., RYNKIEWICZ L.M. and POTTINGER R.E. (1953). Does the administration of diethylstilbestrol during pregnancy have therapeutic value? *Am J Obstet Gynecol* 66: 1062-1081.
- DOHR, G., TARMANN T. and SCHIECHL H. (1987a). Different antigen expression on Wolffian and Mullerian cells in rat embryos as detected by monoclonal antibodies. *Anat Embryol (Berl)* 176: 239-242.
- DOHR, G., TARMANN T. and SCHIECHL H. (1987b). Different antigen expression on Wolffian and Mullerian cells in rat embryos as detected by monoclonal antibodies. *Anat Embryol (Berl)* 176: 239-242.
- DOLLE, P., DIERICH A., LEMEUR M., SCHIMMANG T., SCHUHBAUR B., CHAMBON P. and DUBOULE D. (1993). Disruption of the Hoxd-13 gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell* 75: 431-441.
- DOLLE, P., IZPISUA-BELMONTE J.C., BROWN J.M., TICKLE C. and DUBOULE D. (1991). HOX-4 genes and the morphogenesis of mammalian genitalia. *Genes Dev* 5: 1767-7.
- DREWS, U., SULAK O. and SCHENCK P.A. (2002). Androgens and the development of the vagina. *Biol Reprod* 67: 1353-1359.
- DREYER, C. and ELLINGER-ZIEGELBAUER H. (1996). Retinoic acid receptors and nuclear orphan receptors in the development of *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* 40: 255-262.

- FRAGA, M.F., BALLESTAR E., PAZ M.F., ROPERO S., SETIEN F., BALLESTAR M.L., HEINE-SUNER D., CIGUDOSA J.C., URIOSTE M., BENITEZ J., BOIX-CHORNET M., SANCHEZ-AGUILERA A., LING C., CARLSSON E., POULSEN P., VAAGA A., STEPHANZ., SPECTOR T.D., WU Y.Z., PLASS C. and ESTELLER M. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10604-10609.
- FUJINO, A., ARANGO N.A., ZHAN Y., MANGANARO T.F., LI X., MAC LAUGHLIN D.T. and DONAHOE P.K. (2009). Cell migration and activated PI3K/AKT-directed elongation in the developing rat Müllerian duct. *Dev Biol* 325: 351-362.
- GENDRON, R.L., PARADIS H., HSIEH-LI H.M., LEE D.W., POTTER S.S. and MARKOFF E. (1997). Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in *Hoxa-11* null mice. *Biol Reprod* 56: 1097-1105.
- GOODMAN, F.R., BACCHELLI C., BRADY A.F., BRUETON L.A., FRYNS J.P., MORTLOCK D.P., INNIS J.W., HOLMES L.B., DONNENFELD A.E., FEINGOLD M., BEEMER F.A., HENNEKAM R.C. and SCAMBLER P.J. (2000). Novel HOXA13 mutations and the phenotypic spectrum of hand-foot-genital syndrome. *Am J Hum Genet* 67: 197-202.
- GRAY, C.A., BARTOL F.F., TARLETON B.J., WILEY A.A., JOHNSON G.A., BAZER F.W. and SPENCER T.E. (2001). Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod* 65: 1311-1323.
- GROOTHUIS, P.G., DASSEN H.H., ROMANO A. and PUNYADEERA C. (2007). Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Hum Reprod Update* 13: 405-417.
- GRUENWALD, P. (1941). The relation of the growing Müllerian duct to the Wolffian duct and its importance for the genesis of malformations. *Anat. Rec.* 81: 1-19.
- GRUN, F. and BLUMBERG B. (2006). Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 147: S50-S55.
- GUIOLI, S., SEKIDO R. and LOVELL-BADGE R. (2007). The origin of the Müllerian duct in chick and mouse. *Dev Biol* 302: 389-398.
- HANNEMA, S.E. and HUGHES I.A. (2007). Regulation of Wolffian duct development. *Horm Res* 67: 142-151.
- HEIKKILA, M., PRUNSKAITE R., NAILLAT F., ITARANTA P., VUORISTO J., LEPPALUOTO J., PELTOKETO H. and VAINIO S. (2005). The partial female to male sex reversal in *Wnt-4*-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. *Endocrinology* 146: 4016-4023.
- HERNANDEZ GIFFORD, J.A., HUNZICKER-DUNN M.E. and NILSON J.H. (2009). Conditional deletion of *b-catenin* mediated by *Amhr2cre* in mice causes female infertility. *Biol Reprod* DOI:10.1095/biolreprod.108.072280.
- HEWITT, S.C. and KORACH K.S. (2002). Estrogen receptors: structure, mechanisms and function. *Rev Endocr Metab Disord* 3: 193-200.
- HOLLIDAY, R. (1990). DNA methylation and epigenetic inheritance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 326: 329-338.
- HOMBRIA, J.C. and LOVEGROVE B. (2003). Beyond homeosis—HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation* 71: 461-476.
- HONMA, S., SUZUKI A., BUCHANAN D.L., KATSU Y., WATANABE H. and IGUCHI T. (2002). Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol* 16: 117-122.
- HORIKAWA, Y., IWASAKI N., HARA M., FURUTA H., HINOKIO Y., COCKBURN B.N., LINDNER T., YAMAGATA K., OGATA M., TOMONAGA O., KUROKI H., KASAHARA T., IWAMOTO Y. and BELL G.I. (1997). Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (*TCF2*) associated with MODY. *Nat Genet* 17: 384-385.
- HOSSAIN, A. and SAUNDERS G.F. (2003). Synergistic cooperation between the beta-catenin signaling pathway and steroidogenic factor 1 in the activation of the Müllerian inhibiting substance type II receptor. *J Biol Chem* 278: 26511-26516.
- HUANG, W.W., YIN Y., BI Q., CHIANG T.C., GARNER N., VUORISTO J., MCLACHLAN J.A. and MAL L. (2005). Developmental diethylstilbestrol exposure alters genetic pathways of uterine cytodifferentiation. *Mol Endocrinol* 19: 669-682.
- IIZUKA-KOGO, A., ISHIDAO T., AKIYAMA T. and SENDA T. (2007). Abnormal development of urogenital organs in *Dlg1*-deficient mice. *Development* 134: 1799-1807.
- INCE, T.A., CVIKO A.P., QUADE B.J., YANG A., MCKEON F.D., MUTTER G.L. and CRUM C.P. (2002). p63 Coordinates anogenital modeling and epithelial cell differentiation in the developing female urogenital tract. *Am J Pathol* 161: 1111-1117.
- ITO, T., IKEDA T., GOMI H., NAKAO S., SUZUKI T. and ITOHARA S. (1997). Unaltered secretion of beta-amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2)-deficient mice. *J Biol Chem* 272: 22389-22392.
- JACOB, M., KONRAD K. and JACOB H.J. (1999). Early development of the müllerian duct in avian embryos with reference to the human. An ultrastructural and immunohistochemical study. *Cells Tissues Organs* 164: 63-81.
- JAMIN, S.P., ARANGO N.A., MISHINA Y., HANKS M.C. and BEHRINGER R.R. (2002). Requirement of *Bmpr1a* for Müllerian duct regression during male sexual development. *Nat Genet* 32: 408-410.
- JAMIN, S.P., ARANGO N.A., MISHINA Y., HANKS M.C. and BEHRINGER R.R. (2003). Genetic studies of the AMH/MIS signaling pathway for Müllerian duct regression. *Mol Cell Endocrinol* 211: 15-19.
- JEFFERSON, W.N., COUSE J.F., PADILLA-BANKS E., KORACH K.S. and NEWBOLD R.R. (2002). Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER)alpha expression and multiocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions. *Biol Reprod* 67: 1285-1296.
- JEFFERSON, W.N., PADILLA-BANKS E. and NEWBOLD R.R. (2007). Disruption of the female reproductive system by the phytoestrogen genistein. *Reprod Toxicol* 23: 308-316.
- JOSSO, N., CATE R.L., PICARD J.Y., VIGIER B., DI CLEMENTE N., WILSON C., IMBEAUD S., PEPINSKY R.B., GUERRIER D., BOUSSIN L. and et al. (1993). Anti-müllerian hormone: the Jost factor. *Recent Prog Horm Res* 48: 1-59.
- JOST, A. (1953). Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog Horm Res* 8: 379-418.
- KAUFMAN, R.H., ADAM E., HATCH E.E., NOLLER K., HERBST A.L., PALMER J.R. and HOOVER R.N. (2000). Continued follow-up of pregnancy outcomes in diethylstilbestrol-exposed offspring. *Obstet Gynecol* 96: 483-489.
- KIM, Y., KOBAYASHI A., SEKIDO R., DINAPOLI L., BRENNAN J., CHABOISSIER M.C., POULAT F., BEHRINGER R.R., LOVELL-BADGE R. and CAPEL B. (2006). *Fgf9* and *Wnt4* act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol* 4: e187.
- KIM, H., HAYASHI S., CHAMBON P., WATANABE H., IGUCHI T. and SATO, T. (2009). Effects of diethylstilbestrol on ovarian follicle development in neonatal mice. *Reprod. Toxicol.* 27: 55-62.
- KITAJEWSKI, J. and SASSOON D. (2000). The emergence of molecular gynecology: homeobox and *Wnt* genes in the female reproductive tract. *Bioessays* 22: 902-910.
- KLATTIG, J., SIERIG R., KRUSPE D., BESENBECK B. and ENGLERT C. (2007). Wilms' tumor protein *Wt1* is an activator of the anti-Müllerian hormone receptor gene *Amhr2*. *Mol Cell Biol* 27: 4355-4364.
- KOBAYASHI, A. and BEHRINGER R.R. (2003). Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat Rev Genet* 4: 969-980.
- KOBAYASHI, A., KWAN K.M., CARROLL T.J., MCMAHON A.P., MENDELSON C.L. and BEHRINGER R.R. (2005). Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development* 132: 2809-2823.
- KOBAYASHI, A., SHAWLOT W., KANIA A. and BEHRINGER R.R. (2004). Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development. *Development* 131: 539-549.
- KOLATSI-JOANNOU, M., BINGHAM C., ELLARD S., BULMAN M.P., ALLEN L.I., HATTERSLEY A.T. and WOOLF A.S. (2001). Hepatocyte nuclear factor-1beta: a new kindred with renal cysts and diabetes and gene expression in normal human development. *J Am Soc Nephrol* 12: 2175-2180.
- KOMATSU, M. and FUJITA H. (1978). Electron-microscopic studies on the development and aging of the oviduct epithelium of mice. *Anat Embryol (Berl)* 152: 243-259.
- KURITA, T., COOKE P.S. and CUNHA G.R. (2001). Epithelial-stromal tissue interaction in paramesonephric (Müllerian) epithelial differentiation. *Dev Biol* 240: 194-211.
- KURITA, T., MILLS A.A. and CUNHA G.R. (2004). Roles of p63 in the diethylstilbestrol-induced cervicovaginal adenosis. *Development* 131: 1639-1649.

- LI, S., HANSMAN R., NEWBOLD R., DAVIS B., MCLACHLAN J.A. and BARRETT J.C. (2003). Neonatal diethylstilbestrol exposure induces persistent elevation of c-fos expression and hypomethylation in its exon-4 in mouse uterus. *Mol Carcinog* 38: 78-84.
- LI, S., MA L., CHIANG T., BUROW M., NEWBOLD R.R., NEGISHI M., BARRETT J.C. and MCLACHLAN J.A. (2001a). Promoter CpG methylation of Hox-a10 and Hox-a11 in mouse uterus not altered upon neonatal diethylstilbestrol exposure. *Mol Carcinog* 32: 213-219.
- LI, S., MA L., CHIANG T., BUROW M., NEWBOLD R.R., NEGISHI M., BARRETT J.C. and MCLACHLAN J.A. (2001b). Promoter CpG methylation of Hox-a10 and Hox-a11 in mouse uterus not altered upon neonatal diethylstilbestrol exposure. *Mol Carcinog* 32: 213-219.
- LI, S., WASHBURN K.A., MOORE R., UNO T., TENG C., NEWBOLD R.R., MCLACHLAN J.A. and NEGISHI M. (1997). Developmental exposure to diethylstilbestrol elicits demethylation of estrogen-responsive lactoferrin gene in mouse uterus. *Cancer Res* 57: 4356-4359.
- LINDNER, T.H., NJOLSTAD P.R., HORIKAWA Y., BOSTAD L., BELL G.I. and SOVIK O. (1999). A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta. *Hum Mol Genet* 8: 2001-2008.
- LOOSE-MITCHELL, D.S., CHIAPPETTA C. and STANCEL G.M. (1988). Estrogen regulation of c-fos messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* 2: 946-951.
- MA, L., BENSON G.V., LIM H., DEY S.K. and MAAS R.L. (1998). Abdominal B (AbdB) Hoxa genes: regulation in adult uterus by estrogen and progesterone and repression in Mullerian duct by the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES). *Dev Biol* 197: 141-154.
- MARKEY, C.M., COOMBS M.A., SONNENSCHIN C. and SOTO A.M. (2003). Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evol Dev* 5: 67-75.
- MCLACHLAN, J.A., NEWBOLD R.R. and BULLOCK B.C. (1980). Long-term effects on the female mouse genital tract associated with prenatal exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Res* 40: 3988-3999.
- MENDELSON, C., LOHNES D., DECIMO D., LUFKIN T., LEMEURE M., CHAMBER P. and MARK M. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 120: 2749-2771.
- MERICSKAY, M., KITAJEWSKI J. and SASSOON D. (2004). Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development* 131: 2061-2072.
- MILLER, C., DEGENHARDT K. and SASSOON D.A. (1998a). Fetal exposure to DES results in de-regulation of Wnt7a during uterine morphogenesis. *Nat Genet* 20: 228-230.
- MILLER, C., PAVLOVA A. and SASSOON D.A. (1998b). Differential expression patterns of Wnt genes in the murine female reproductive tract during development and the estrous cycle. *Mech Dev* 76: 91-99.
- MILLER, C. and SASSOON D.A. (1998). Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development* 125: 3201-3211.
- MISHINA, Y., REY R., FINEGOLD M.J., MATZUK M.M., JOSSO N., CATE R.L. and BEHRINGER R.R. (1996). Genetic analysis of the Mullerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev* 10: 2577-2587.
- MIYAMOTO, N., YOSHIDA M., KURATANI S., MATSUO I. and AIZAWA S. (1997). Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development* 124: 1653-1664.
- MORCEL, K., CAMBORIEUX L. and GUERRIER D. (2007). Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2: 13.
- MORTLOCK, D.P. and INNIS J.W. (1997). Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. *Nat Genet* 15: 179-80.
- MURAMATSU, M. and INOUE S. (2000). Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem Biophys Res Commun* 270: 1-10.
- NELSON, K.G., SAKAI Y., EITZMAN B., STEED T. and MCLACHLAN J. (1994). Exposure to diethylstilbestrol during a critical developmental period of the mouse reproductive tract leads to persistent induction of two estrogen-regulated genes. *Cell Growth Differ* 5: 595-606.
- NEWBOLD, R.R., BANKS E.P., BULLOCK B. and JEFFERSON W.N. (2001). Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res* 61: 4325-4328.
- NEWBOLD, R.R., BULLOCK B.C. and MCLACHLAN J.A. (1990). Uterine adenocarcinoma in mice following developmental treatment with estrogens: a model for hormonal carcinogenesis. *Cancer Res* 50: 7677-7681.
- NEWBOLD, R.R., HANSON R.B. and JEFFERSON W.N. (1997). Ontogeny of lactoferrin in the developing mouse uterus: a marker of early hormone response. *Biol Reprod* 56: 1147-1157.
- NEWBOLD, R.R., HANSON R.B., JEFFERSON W.N., BULLOCK B.C., HASEMAN J. and MCLACHLAN J.A. (1998). Increased tumors but uncompromised fertility in the female descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis* 19: 1655-1663.
- NEWBOLD, R.R., JEFFERSON W.N. and PADILLA-BANKS E. (2007a). Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. *Reprod Toxicol* 24: 253-258.
- NEWBOLD, R.R., PADILLA-BANKS E., SNYDER R.J. and JEFFERSON W.N. (2007b). Perinatal exposure to environmental estrogens and the development of obesity. *Mol Nutr Food Res* 51: 912-917.
- NEWBOLD, R.R., PADILLA-BANKS E., SNYDER R.J., PHILLIPS T.M. and JEFFERSON W.N. (2007c). Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Reprod Toxicol* 23: 290-296.
- OPPELT, P., S P.R., KELLERMANN A., BRUCKER S., G A.H., K S.L., P L.S., STRICK R., WALLWIENER D. and M W.B. (2005a). Clinical aspects of Mayer-Rokitansky-Kuester-Hauser syndrome: recommendations for clinical diagnosis and staging. *Hum Reprod* 21: 792-797.
- OPPELT, P., STRISSEL P.L., KELLERMANN A., SEEBER S., HUMENY A., BECKMANN M.W. and STRICK R. (2005b). DNA sequence variations of the entire anti-Mullerian hormone (AMH) gene promoter and AMH protein expression in patients with the Mayer-Rokitanski-Kuster-Hauser syndrome. *Hum Reprod* 20: 149-157.
- ORVIS, G.D. and BEHRINGER R.R. (2007). Cellular mechanisms of Mullerian duct formation in the mouse. *Dev Biol* 306: 493-504.
- PARR, B.A., AVERY E.J., CYGAN J.A. and MCMAHON A.P. (1998). The classical mouse mutant postaxial hemimelia results from a mutation in the Wnt 7a gene. *Dev Biol* 202: 228-234.
- PARR, B.A. and MCMAHON A.P. (1998). Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature* 395: 707-710.
- POIRIER, L.A. and VLASOVA T.I. (2002). The prospective role of abnormal methyl metabolism in cadmium toxicity. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 5: 793-795.
- REBER, M. and CEREGHINI S. (2001). Variant hepatocyte nuclear factor 1 expression in the mouse genital tract. *Mech Dev* 100: 75-78.
- ROBERT, B. and LALLEMAND Y. (2006). Anteroposterior patterning in the limb and digit specification: contribution of mouse genetics. *Dev Dyn* 235: 2337-2352.
- ROBERTS, L.M., VISSER J.A. and INGRAHAM H.A. (2002). Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development. *Development* 129: 1487-1496.
- SAINIO, K., HELLSTEDT P., KREIDBERG J.A., SAXEN L. and SARIOLA H. (1997). Differential regulation of two sets of mesonephric tubules by WT-1. *Development* 124: 1293-1299.
- SAINIO, K. and RAATIKAINEN-AHOKAS A. (1999). Mesonephric kidney—a stem cell factory? *Int J Dev Biol* 43: 435-439.
- SALNIKOW, K. and COSTA M. (2000). Epigenetic mechanisms of nickel carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19: 307-318.
- SATO, K., FUKATA H., KOGO Y., OHGANE J., SHIOTA K. and MORI, C. (2009). Neonatal exposure to diethylstilbestrol alters expression of DNA methyltransferases and methylation of genomic DNA in mouse uterus. *Endocrinol J* 56: 131-139.
- SAXEN, L. and SARIOLA H. (1987). Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol* 1: 385-392.
- TABB, M.M. and BLUMBERG B. (2006). New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol Endocrinol* 20: 475-482.
- TANG, W.Y., NEWBOLD R., MARDILOVICH K., JEFFERSON W., CHENG R.Y.S., MEDVEDOVIC M. and HO, S.M. (2008). Persistent hypomethylation in the

- promoter of nucleosomal binding protein 1 (Nsbp1) correlates with overexpression of Nsbp1 in mouse uteri neonatally exposed to diethylstilbestrol or genistein. *Endocrinology* 149: 5922-5931.
- TAYLOR, H.S., VANDEN HEUVEL G.B. and IGARASHI P. (1997). A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod* 57: 1338-1345.
- TONG, G.X., CHIRIBOGA L., HAMELE-BENA D. and BORCZUK A.C. (2007). Expression of PAX2 in papillary serous carcinoma of the ovary: immunohistochemical evidence of fallopian tube or secondary Müllerian system origin? *Mod Pathol* 20: 856-863.
- TORRES, M., GOMEZ-PARDO E., DRESSLER G.R. and GRUSS P. (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development* 121: 4057-4065.
- VAINIO, S., HEIKKILA M., KISPERT A., CHIN N. and MCMAHON A.P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397: 405-409.
- WALKER, B.E. and HAVEN M.I. (1997). Intensity of multigenerational carcinogenesis from diethylstilbestrol in mice. *Carcinogenesis* 18: 791-793.
- WAROT, X., FROMENTAL-RAMAIN C., FRAULOB V., CHAMBON P. and DOLLE P. (1997). Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts. *Development*. 124: 4781-4791.
- WATERLAND, R.A., LIN J.R., SMITH C.A. and JIRTLE R.L. (2006). Post-weaning diet affects genomic imprinting at the insulin-like growth factor 2 (Igf2) locus. *Hum Mol Genet* 15: 705-716.
- WOLFF, G.L., KODELL R.L., MOORE S.R. and COONEY C.A. (1998). Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J* 12: 949-957.
- WROBEL, K.H., HEES I., SCHIMMEL M. and STAUBER E. (2002). The genus *Acipenser* as a model system for vertebrate urogenital development: nephrostomial tubules and their significance for the origin of the gonad. *Anat Embryol (Berl)* 205: 67-80.
- YIN, Y., LIN C. and MA L. (2006). MSX2 promotes vaginal epithelial differentiation and wolffian duct regression and dampens the vaginal response to diethylstilbestrol. *Mol Endocrinol* 20: 1535-1546.
- ZHAN, Y., FUJINO A., MACLAUGHLIN D.T., MANGANARO T.F., SZOTEK P.P., ARANGO N.A., TEIXEIRA J. and DONAHOE P.K. (2006). Mullerian inhibiting substance regulates its receptor/SMAD signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Mullerian duct regression. *Development* 133: 2359-2369.
- ZHAO, Y. and POTTER S.S. (2001). Functional specificity of the Hoxa13 homeobox. *Development* 128: 3197-3207.



# Partie 1

*Etude du rôle de la voie Wnt au cours du  
développement normal du tractus génital  
chez la souris*

# Partie 1

## Etude du rôle de la voie Wnt au cours du développement normal du tractus génital chez la souris

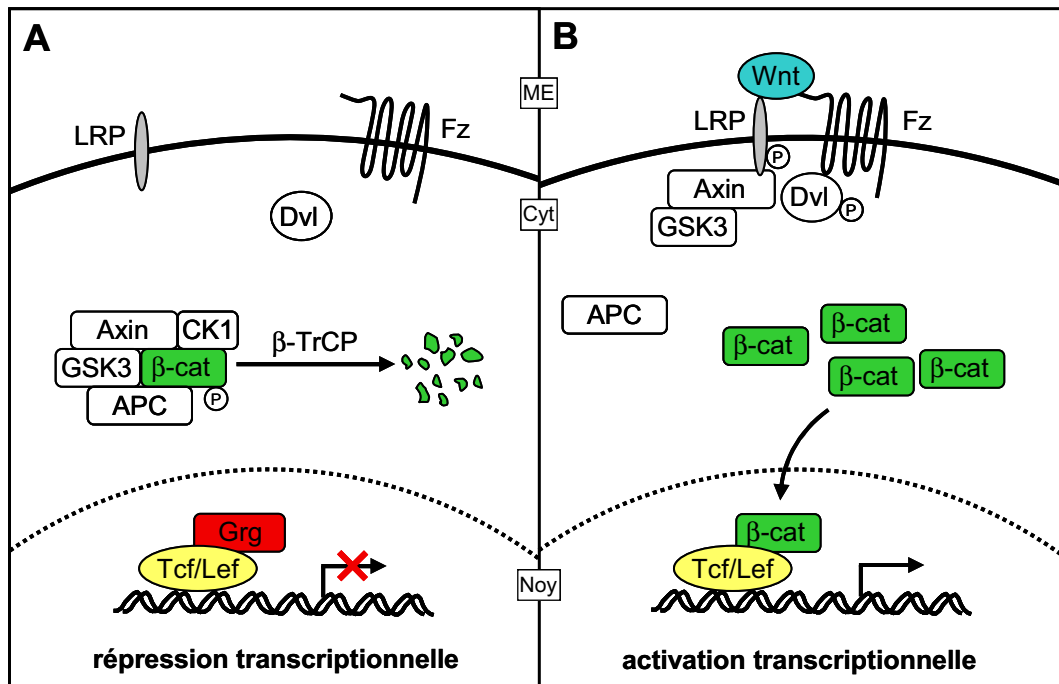
### I. Voies Wnt et développement du tractus génital

#### A) Les voies de signalisation Wnt

Au cours du développement embryonnaire, la spécification et l'arrangement correct des types cellulaires nouvellement générés lors de la différenciation tissulaire requièrent une régulation coordonnée de l'expression des gènes effecteurs et des interactions précises entre cellules voisines. Plusieurs voies de signalisation participent de façon coopérative à cette orchestration finement contrôlée, par l'activation de programmes génétiques distincts et spécifiques d'un type cellulaire ou d'un stade développemental. A l'instar des voies TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), FGF (Fibroblast Growth Factor), Hedgehog ou encore Notch, la signalisation par les facteurs Wnt (Wingless-type MMTV Integration Site Family) joue un rôle fondamental dans ces processus développementaux (Clevers, 2006). Ce mécanisme moléculaire, conservé chez tous les Métazoaires, permet à des cellules voisines de « converser » entre elles et de coordonner ainsi une grande diversité de processus cellulaires : détermination cellulaire, contrôle de la balance prolifération/différenciation et de l'équilibre survie/apoptose, régulation de l'adhésion cellulaire et de la migration lors d'événements morphogénétiques (Logan and Nusse, 2004). Egalement impliquée dans l'auto-renouvellement et l'homéostasie de certains tissus chez l'adulte, la signalisation Wnt est associée, en cas de dérégulation, à l'apparition de nombreuses affections humaines comme des cancers ou des malformations congénitales (Moon *et al.*, 2004).

Les protéines de la famille Wnt, au nombre de 19 chez les Mammifères, sont des glycoprotéines sécrétées agissant de manière locale, le plus souvent par liaison à des co-récepteurs membranaires des familles Frizzled (Fz) et LRP (Low density lipoprotein Receptor-related Protein) présents à la surface des cellules cibles. Ces signaux Wnt extracellulaires sont capables d'activer plusieurs cascades de transduction de signaux intracellulaires :

- la voie dite « canonique », la plus étudiée, régulant l'activité transcriptionnelle de gènes cibles *via* la  $\beta$ -caténine,
- des voies « non-canoniques », *i.e.* indépendantes de la  $\beta$ -caténine, incluant la voie Wnt/PCP (Planar Cell Polarity) et la voie Wnt/Ca<sup>2+</sup>.



**Figure 4. La voie Wnt canonique ou Wnt/ $\beta$ -caténine.** A) En absence de signal Wnt, la  $\beta$ -caténine est associée à un complexe multiprotéique de destruction composé de l'axine, l'APC et des sérine-thréonine kinases CK1 et GSK3 $\alpha/\beta$ . Ces dernières phosphorylent la  $\beta$ -caténine, laquelle est alors reconnue par un complexe d'ubiquitinylation dédié comprenant  $\beta$ -TrCP. La  $\beta$ -caténine ubiquitinylée est ensuite rapidement dégradée par le protéasome. Dans le noyau, l'interaction des facteurs Tcf/Lef avec des co-répresseurs transcriptionnels, notamment Groucho (Grg), inhibe la transcription des gènes cibles de la voie Wnt. B) La liaison du ligand Wnt au complexe de co-récepteurs Frizzled(Fz)/LRP induit la phosphorylation de LRP et le recrutement de l'axine à la membrane cytoplasmique probablement *via* l'activation de Dsh. L'inhibition du complexe de destruction Axine-APC-GSK3 entraîne l'accumulation cytosolique de  $\beta$ -caténine libre et sa translocation au niveau nucléaire. Dans le noyau, la  $\beta$ -caténine déplace Grg pour promouvoir, en partenariat avec les facteurs Tcf/Lef, la transcription des gènes cibles de la voie Wnt. ME, Milieu Extracellulaire ; Cyt, Cytoplasme ; Noy, Noyau.

Cette subdivision de la signalisation Wnt en voies canonique et non-canoniques indépendamment activées, de plus en plus remise en cause, laisse la place à une conception plus réaliste d'une intrication extrême de ces voies de signalisation dont le fonctionnement en réseau implique une intégration à tous les niveaux de multiples signaux (van Amerongen and Nusse, 2009).

Par nécessité de simplification, les voies de signalisation Wnt dépendant ou non de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine seront néanmoins présentées de manière séparée dans les chapitres suivants afin d'en introduire les acteurs majeurs, avec une attention particulière portée à la voie « canonique ».

### 1) La voie Wnt canonique

La voie Wnt canonique est définie par sa capacité à réguler l'expression de gènes cibles de façon dépendante de la  $\beta$ -caténine, acteur central de cette voie de signalisation. Initialement identifiée en tant que lien moléculaire entre les cadhérines et le cytosquelette (Ozawa *et al.*, 1989), plusieurs études ont depuis montré qu'il existe un pool cytoplasmique de  $\beta$ -caténine dont la concentration, la localisation et l'activité sont modulées par l'état d'activation de la voie Wnt.

#### 1-1) La $\beta$ -caténine, un co-activateur transcriptionnel

En absence de signal Wnt extracellulaire (**Figure 4**), la  $\beta$ -caténine cytoplasmique est recrutée au sein d'un complexe de destruction assemblé autour d'une protéine d'échafaudage, l'axine (Axis inhibition protein) (Behrens *et al.*, 1998; Fagotto *et al.*, 1999). Ce complexe comprend, outre l'axine, le suppresseur de tumeur APC (Adenomatous Polyposis Coli) ainsi que les sérine-thréonine kinases GSK3 (Glycogen synthase-3) et CK1 (Casein Kinase-1). Ces deux dernières phosphorylent séquentiellement la  $\beta$ -caténine à son extrémité N-terminale sur des résidus sérine et thréonine très conservés, induisant sa reconnaissance par la protéine  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -Transducin repeat Containing Protein), l'un des composants d'un complexe E3 ubiquitine-ligase dédié. L'ubiquitinylation de la  $\beta$ -caténine par ce complexe provoque sa dégradation rapide par le protéasome (Aberle *et al.*, 1997), assurant le maintien d'une concentration basse de  $\beta$ -caténine cytosolique. L'interaction d'un ligand Wnt avec les domaines extracellulaires des co-récepteurs Fz et LRP-5/6 initie la cascade de signalisation dont l'une des étapes est l'inhibition du complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine. Ce

mécanisme, assez mal caractérisé au niveau moléculaire mais faisant vraisemblablement intervenir la protéine Dishevelled (Dvl) (Wallingford and Habas, 2005), a pour conséquence une hypophosphorylation de la  $\beta$ -caténine, laquelle échappe ainsi au système de dégradation du protéasome et s'accumule sous forme stable dans le cytoplasme, favorisant sa translocation dans le noyau. La  $\beta$ -caténine nucléaire interagit alors avec les facteurs de la famille Tcf/Lef (T-cell-specific transcription factor/Lymphoid enhancer binding factor) pour réguler la transcription de gènes cibles (Behrens *et al.*, 1996; Brunner *et al.*, 1997).

Les protéines Tcf/Lef appartiennent à la superfamille de facteurs de transcription à boîte HMG (High-mobility Group), un domaine de liaison à l'ADN leur conférant une certaine spécificité de liaison au motif WRE (Wnt-response Element). Ces protéines ne sont pas des facteurs de transcription à proprement parler puisqu'ils ont besoin d'interagir avec d'autres co-facteurs pour réguler la transcription de gènes cibles. En absence de signal Wnt, leur association avec des co-répresseurs transcriptionnels, dont CtBP (Brannon *et al.*, 1999), Groucho/TLE1 et des histones déacétylases (Roose *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999), inhibe la transcription de gènes cibles vraisemblablement par modification de la structure chromatinienne locale. La liaison de la  $\beta$ -caténine à l'extrémité N-terminale des facteurs Tcf/Lef déplace physiquement la protéine Groucho/TLE1 (Daniels and Weis, 2005) et favorise l'assemblage d'un complexe multimérique comprenant notamment l'histone acétyltransférase CBP/p300 (Takemaru and Moon, 2000) et un membre du complexe SWI/SNF, Brg1 (Barker *et al.*, 2001), tous deux impliqués dans le remodelage de la chromatine. De nombreux autres partenaires nucléaires du complexe bipartite Tcf/Lef- $\beta$ -caténine sont nécessaires à l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de la voie Wnt (Mosimann *et al.*, 2009).

Une multitude de gènes cibles, *i.e.* présentant des sites fonctionnels de liaison aux facteurs Tcf/Lef, ont été identifiés. Ces gènes sont impliqués dans presque tous les aspects de la physiologie cellulaire : cycle cellulaire, adhésion, transduction de signal (dont la voie Wnt), différenciation... Une liste très complète et régulièrement mise à jour est disponible sur le site <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html> élaboré par R. Nusse, compilant les avancées majeures sur la voie Wnt.

## 1-2) La $\beta$ -caténine et les jonctions adhérentes

Outre son rôle de co-activateur transcriptionnel, la  $\beta$ -caténine a également une fonction structurale dans les cellules épithéliales en tant que composant des jonctions

adhérentes, et constitue un partenaire essentiel de différentes cadhérines dont elle fixe le domaine cytoplasmique (Peifer *et al.*, 1992). A l'inverse du pool cytoplasmique de  $\beta$ -caténine disponible pour médier la transduction du signal Wnt, le pool lié aux jonctions adhérentes apparaît très stable. Une interconnexion des fonctions d'adhésion et de signalisation de la  $\beta$ -caténine, encore hypothétique (Nelson and Nusse, 2004), constituerait un excellent moyen de coupler la régulation de l'expression des gènes avec les modifications d'interactions cellule-cellule et/ou les processus de migration cellulaire.

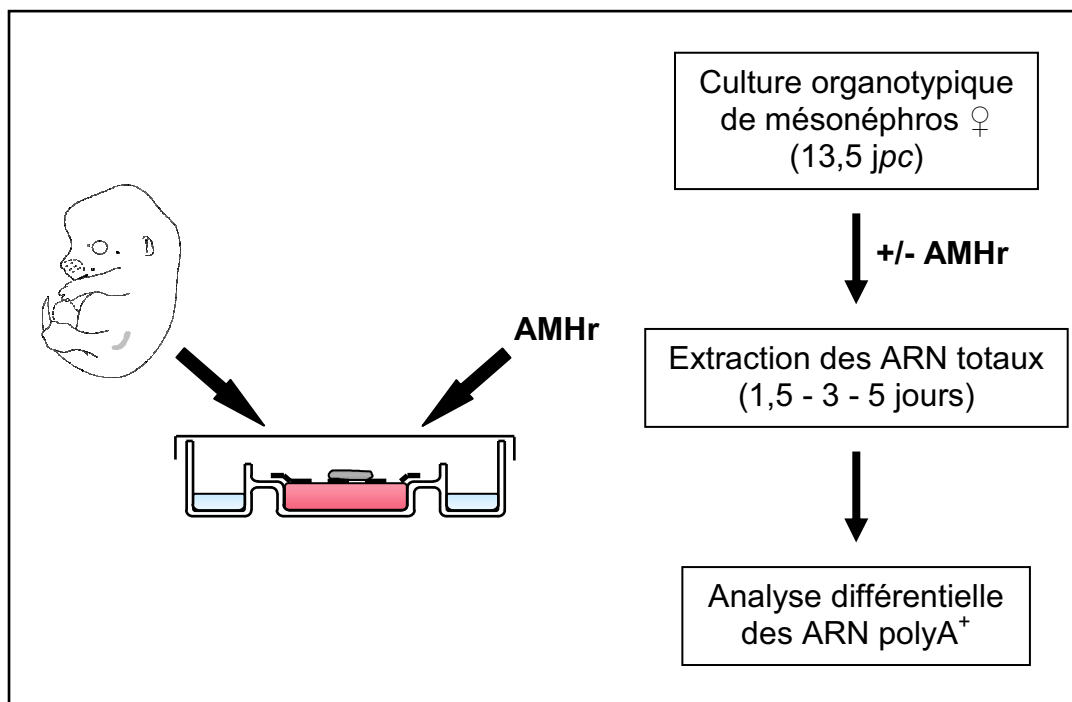
## 2) Les voies non-canoniques

En parallèle de la voie Wnt canonique, les voies non-canoniques font référence à des cascades de transduction de signaux dans lesquelles les ligands Wnt et/ou d'autres composants de la voie canonique interviennent de manière indépendante de la  $\beta$ -caténine (Veeman *et al.*, 2003). Ces cascades de transduction, qui agissent dans le cadre de mécanismes morphogénétiques, n'impliquent pas de régulation transcriptionnelle directe mais induisent plutôt des modifications à l'échelle cellulaire : réarrangements du cytosquelette, contrôle de la migration des cellules, mise en place de la polarité cellulaire au sein des tissus...

### 2-1) La voie Wnt/PCP

Voie non-canonique la mieux caractérisée, la voie Wnt/PCP est requise pour l'établissement de la polarité cellulaire au sein des tissus embryonnaires. Cette voie a été initialement identifiée chez la drosophile où elle régule, parmi d'autres événements morphogénétiques, la polarisation des cellules lors de l'établissement de la polarité planaire dans la cuticule adulte (pour revue (Strutt, 2003)). Chez les Vertébrés, elle s'est notamment révélée essentielle aux mouvements de convergence-extension, un phénomène par lequel l'intercalation de cellules du mésoderme axial permet l'allongement de l'axe antéro-postérieur lors de la gastrulation (Keller, 2002).

Ce processus, grâce auquel des cellules épithéliales s'orientent relativement au plan du champ cellulaire (*i.e.* de l'épithélium) où elles résident, est actuellement l'objet de nombreuses investigations dont les conclusions sont pour le moment difficiles à réconcilier au sein d'un modèle moléculaire unique (Lawrence *et al.*, 2008).



**Figure 5. Protocole expérimental mis en œuvre pour l'étude des ARN messagers (ARNm) différenciellement exprimés sous l'action de l'AMH.** Des mésonéphros de souris femelles sont mis en culture au stade 13,5 *jpc* (jours post-coïtum), *i.e.* au stade sexuellement indifférencié, puis soumis ou non à l'action de l'AMH recombinante (AMHr). Après culture pendant 1,5, 3 ou 5 jours, les ARN totaux sont extraits et sont utilisés pour une analyse différentielle par DDRT-PCR.

## 2-2) La voie Wnt/Ca<sup>2+</sup>

La voie non-canonique Wnt/Ca<sup>2+</sup> a été définie par la propension de certains ligands Wnt à stimuler le relargage intracellulaire d'ions Ca<sup>2+</sup> et l'activation subséquente des kinases CamKII et PKC (Kuhl *et al.*, 2000).

A l'image de la voie Wnt/PCP, cette cascade de signalisation qui semble indépendante de la  $\beta$ -caténine, est également impliquée dans le développement embryonnaire et est considérée comme une voie régulatrice majeure de l'organisation précoce chez l'embryon. La voie Wnt/Ca<sup>2+</sup> est notamment cruciale pour la mise en place correcte des axes embryonnaires *via* l'inhibition de la voie Wnt canonique (Weidinger and Moon, 2003).

### B) Développement du tractus génital : implication d'un nouvel acteur de la voie Wnt ?

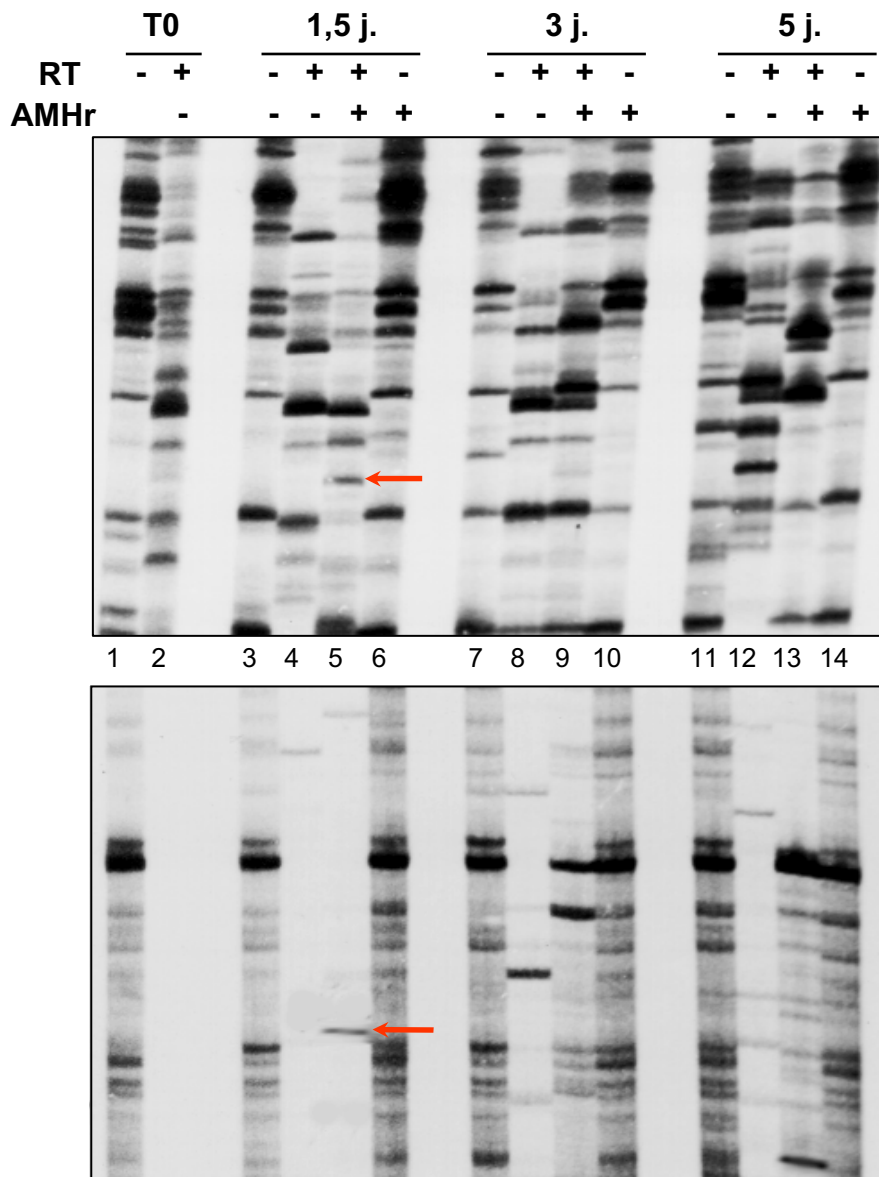
Comme le souligne la revue bibliographique précédente, le développement sexuellement dimorphique chez les Mammifères repose sur une cascade génétique complexe dans laquelle les gènes *Wnt* et d'autres composants régulateurs de cette voie de signalisation, dont la  $\beta$ -caténine elle-même, ont une importance fondamentale. Toutes les étapes de ce processus développemental sont concernées : formation des canaux de Wolff et de Müller, mise en place et différenciation des gonades, régression des canaux müllériens sous l'action de l'AMH, différenciation des voies génitales internes... De la même façon, le développement normal des organes génitaux externes et des glandes mammaires dépend, au moins partiellement, de la voie de signalisation Wnt (Yamaguchi *et al.*, 1999; Brisken *et al.*, 2000).

#### 1) Caractérisation d'un effecteur terminal de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par un test *in vitro* de régression des canaux de Müller

Au sein de notre équipe, l'étude du rôle de la voie Wnt au cours du développement du tractus génital est fondée sur les résultats d'une expérience « historique », menée par mon directeur de recherches Daniel Guerrier et Soazik Jamin alors en thèse, cherchant à caractériser d'un point de vue moléculaire le mode d'action de l'AMH.

Cette expérience s'appuie sur la mise au point d'un modèle *in vitro* de régression des canaux müllériens. Le protocole expérimental utilisé consiste en l'établissement de cultures organotypiques de mésonéphros de souris femelles au stade sexuellement indifférencié (**Figure 5**). Après différents temps de culture en présence ou non d'AMH recombinante (AMHr), les ARN totaux sont extraits puis analysés par la technique de DDRT-PCR





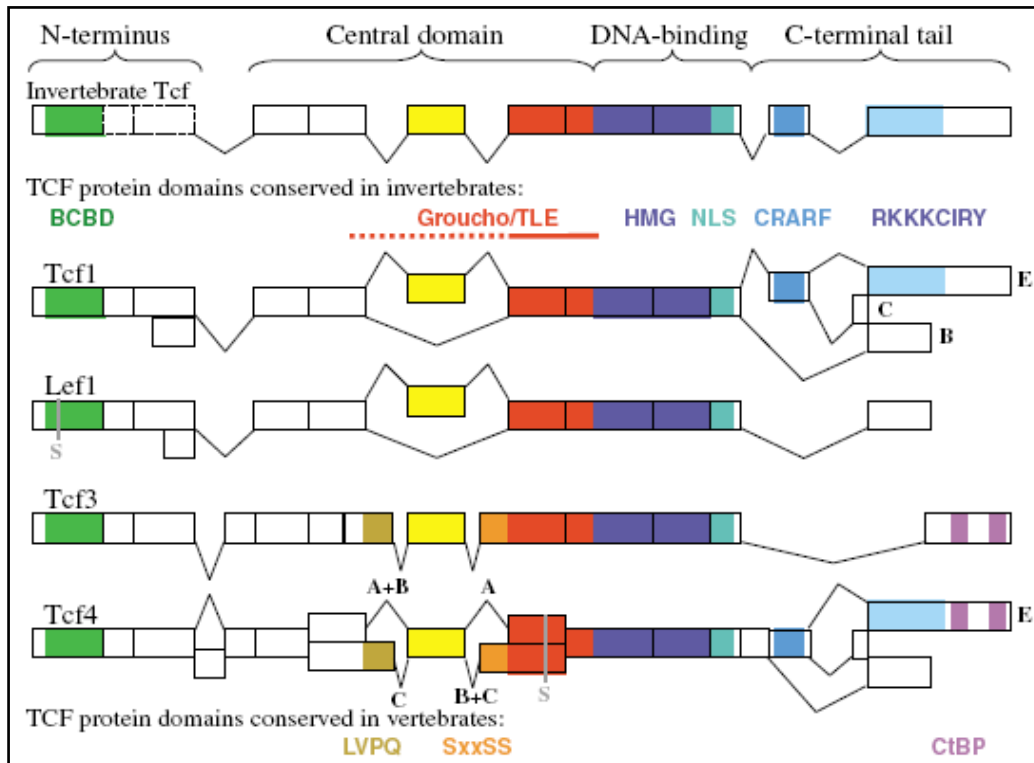
**Figure 6. Révélation auto-radiographique après migration en gel de polyacrylamide des produits de DDRT-PCR.** Les deux films ci-dessus correspondent à deux expériences de DDRT-PCR identiques et indépendantes. Une analyse de l'ensemble des bandes différentielles en fonction des conditions de culture a notamment permis d'observer de manière reproductible l'apparition d'une bande après 1,5 jour (1,5 j.) de culture en présence d'AMH recombinante (flèche rouge, pistes 5). Après élution et sous-clonage, le séquençage de ce fragment d'ADNc a montré qu'il correspond à un ARNm alternatif du gène *mTcf712*. RT, Reverse-Transcriptase.

(Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) (Liang and Pardee, 1992) afin de détecter des gènes différentiellement exprimés sous l'action de l'AMH. Cette technique, visant à comparer les ARNm de deux populations cellulaires distinctes, repose sur une première étape de transcription inverse à l'aide d'amorces oligo(dT) suivie d'une amplification par PCR des ADN complémentaires (ADNc) synthétisés. Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour cette PCR sont conçues de telle façon qu'elles permettent l'amplification d'une fraction représentative de la population d'ADNc. Les profils de migration des produits de PCR en gel de polyacrylamide sont ensuite comparés entre conditions expérimentales. Après une étude analytique exhaustive des bandes différentielles obtenues, les résultats issus de deux expériences indépendantes de DDRT-PCR ont révélé la présence d'un ADNc correspondant à un ARNm spécifiquement induit sous l'action de l'AMH après 1,5 jour de culture (**Figure 6**). Le séquençage du produit de PCR sous-cloné correspondant a permis de constater qu'il s'agissait d'un transcrit alternatif du gène *mTcf712* (anciennement dénommé *Tcf4*). Cette expression différentielle sous l'action de l'AMH suggère un rôle des produits de ce gène soit au cours de la régression des canaux de Müller, soit dans les mécanismes très précoces de masculinisation gonadique, deux processus observés dans le cadre du freemartinisme, une pathologie principalement rencontrée chez les bovins lors de grossesses gémellaires hétérosexuées (Vigier *et al.*, 1984; Vigier *et al.*, 1987).

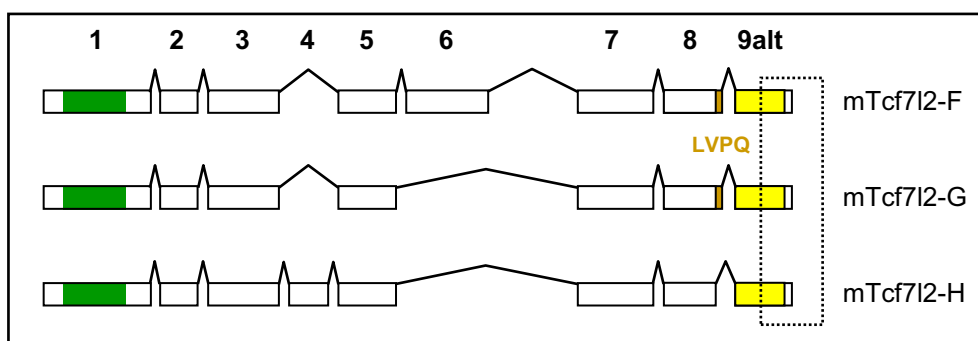
Ces données, non publiées, constituent le point de départ de notre étude du rôle de *mTcf712* au cours du développement sexuellement dimorphique du tractus génital interne chez la souris. Nos premières investigations ont consisté à étudier dans le détail la structure du gène *mTcf712* ainsi que les produits de ce gène dans les bases de données disponibles.

## 2) *mTcf712*, un membre de la famille *Tcf/Lef*

Le gène *mTcf712* appartient à la famille de gènes *Tcf/Lef* encodant les partenaires nucléaires de la  $\beta$ -caténine, impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes-cibles de la voie Wnt canonique. Chez les Vertébrés, la famille TCF/LEF comprend, outre TCF7L2, trois autres membres : TCF7, TCF7L1 et LEF1. Comme introduit au chapitre précédent (*Cf. chapitre I-A-1-1*), les facteurs Tcf/Lef sont les médiateurs terminaux de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, agissant au niveau nucléaire par le recrutement de la  $\beta$ -caténine et de ses co-activateurs transcriptionnels sur les éléments de réponse WRE. Chacun des gènes de cette petite famille encodent plusieurs isoformes protéiques par le biais d'événements d'épissage



**Figure 7. Diversité structurale des protéines Tcf/Lef générée par épissage alternatif et usage de promoteurs alternatifs.** Quatre domaines conservés entre Vertébrés et Invertébrés ont été décrits pour les facteurs Tcf/Lef : le domaine N-terminal de liaison à la  $\beta$ -caténine (BCBD), un domaine central, le domaine HMG de liaison à l'ADN et l'extrémité C-terminale de taille variable. Le domaine d'interaction avec le co-répresseur transcriptionnel Groucho/TLE est indiqué en rouge, le signal de localisation nucléaire (NLS) en turquoise. Les motifs LVPQ et SxxSS sont impliqués dans la répression transcriptionnelle de la voie Wnt. Les motifs CRARF et RKKKCIRY constituent le module C-clamp (Cysteine clamp), un second domaine de liaison à l'ADN spécifique de certains gènes cibles. Certaines isoformes des gènes *Tcf711* (*Tcf3*) et *Tcf712* (*Tcf4*) comportent des sites de liaison au répresseur transcriptionnel CtBP. S, site de Sumoylation. D'après (Hoppler and Kavanagh, 2007).



**Figure 8. La bande différentielle spécifiquement induite sous l'action de l'AMH peut correspondre à trois ARNm alternatifs de *mTcf712*.** Le criblage différentiel par DDRT-PCR a conduit au séquençage d'un ADNc partiel correspondant à l'extrémité de l'exon 9 et au début de l'intron 9 de *mTcf712* (rectangle en pointillés), une séquence nucléotidique identifiée dans trois de ses ARNm alternatifs : mTcf712-F, -G et -H. Ces 3 variants d'épissage ont été également identifiés par Douglas et collaborateurs en 2001 étudiant le développement de la glande hypophysaire (Douglas *et al.*, 2001).

alternatif et l'utilisation de promoteurs alternatifs (**Figure 7**). La caractérisation d'une telle diversité dans les isoformes protéiques des facteurs Tcf/Lef suggère qu'elle constitue un moyen de réguler fonctionnellement et de manière très précise la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, notamment au cours du développement embryonnaire en fonction d'un tissu ou d'un stade donné, mais également dans les processus pathologiques (Arce *et al.*, 2006). L'inactivation fonctionnelle du gène *mTcf712* chez la souris a en particulier montré son rôle indispensable dans le maintien des cellules-souches des cryptes intestinales (Korinek *et al.*, 1998a) et la régulation de la différenciation oligodendrocytaire (Ye *et al.*, 2009).

L'ADNc partiel isolé lors du criblage différentiel par DDRT-PCR peut en fait correspondre à trois ARNm alternatifs de *mTcf712* (encodant les isoformes protéiques mTcf712-F, mTcf712-G et mTcf712-H) possédant des caractéristiques communes particulièrement intéressantes. En effet, leur séquence nucléique prédit *in silico* la synthèse de protéines tronquées dépourvues du domaine HMG de liaison à l'ADN, ainsi que du signal de localisation nucléaire mais conservant un domaine de liaison à la  $\beta$ -caténine (**Figure 8**). Ces isoformes pourraient donc exercer un rôle de dominants négatifs vis-à-vis des nombreuses isoformes pleine longueur de ce gène. Une équipe travaillant sur le développement de la glande hypophysaire a cloné ces trois ARNm et a confirmé l'hypothèse selon laquelle les isoformes correspondantes sont capables d'inhiber l'activation transcriptionnelle d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur possédant des sites de fixation aux facteurs Tcf/Lef (Douglas *et al.*, 2001). Cet effet dominant négatif n'est pas la seule fonction attribuée à ces isoformes tronquées. La même équipe a également observé qu'elles potentialisent l'activation transcriptionnelle dépendante de la  $\beta$ -caténine de gènes dont les promoteurs sont dépourvus d'éléments de réponse aux facteurs Tcf/Lef, comme les promoteurs des gènes  $\alpha$ -inhibin ou leptin (Kennell *et al.*, 2003). Ces protéines ont donc un rôle de modulateur transcriptionnel dont les propriétés activatrice ou inhibitrice sont dépendantes de la présence ou non de WRE dans leur promoteur.

La caractérisation par criblage différentiel à partir de cultures organotypiques de mésonephros d'un ADNc encodant l'une de ces isoformes tronquées de *mTcf712* surexprimée sous l'action de l'AMH nous a conduits à étudier son rôle spécifiquement au cours du développement du tractus reproducteur mâle et femelle sur le modèle murin. Le chapitre suivant rend compte de l'ensemble des expériences menées dans ce premier volet de ma thèse.

## II. Etude du rôle de *mTcf7l2* au cours du développement du tractus génital chez la souris

La surexpression d'un ARNm alternatif du gène *mTcf7l2* observée sous l'action de l'AMH sur des mésonéphros de souris femelles sexuellement indifférenciées, suggère un rôle des protéines tronquées correspondantes au cours de la différenciation sexuelle. Cette surexpression, observée très rapidement (1,5 jour d'incubation en présence d'AMH) et à l'aspect très transitoire, nous a ainsi paru plus vraisemblablement liée à la régression des canaux müllériens plutôt qu'à un événement très précoce de l'effet masculinisant de l'AMH sur la gonade. L'analyse du profil d'expression de ce gène a toutefois été menée tant sur les voies génitales internes mâle et femelle que sur les gonades en cours de différenciation, par les techniques de RT-PCR et d'hybridation *in situ* (HIS) sur des tractus urogénitaux isolés ainsi que par western blot.

### A) Matériels et méthodes

#### 1) Matériels biologiques

Dans le cadre de cette étude descriptive, des femelles Swiss CD-1 gestantes sont sacrifiées par dislocation cervicale, et les embryons prélevés à différents stades du développement (de 11,5 *jpc* à 18,5 *jpc*) afin d'en isoler les tractus reproducteurs par microdissection sous loupe binoculaire. Des nouveau-nés sont également sacrifiés le jour de la naissance (0 *jpp*, jour *post-partum*) et à 8 *jpp*. Les différents tissus prélevés sont alors plongés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C pour la préparation d'extraits d'ARN totaux ou de protéines totales, ou traités selon le protocole décrit ci-après pour les expériences d'HIS. Outre les ébauches embryonnaires des voies génitales internes mâle et femelle isolées du stade 11,5 *jpc* au stade 8 *jpp*, leurs gonades sont également prélevées à partir de 13,5 jours de gestation (*i.e.* lorsqu'il devient techniquement possible de les discerner et de les isoler proprement du mésonéphros en différenciation) jusqu'au stade 16,5 *jpc*. Un morceau de queue de chaque embryon au stade 11,5 ou 12,5 *jpc* est prélevé en vue de leur sexage par PCR duplexe, à l'aide de deux couples d'amorces oligonucléotidiques ciblant les gènes *Smpx* (sens, CACAAACCTCCTGAATGCCC ; antisens, TTGACCAAAGACCGTGGG) et *Sry* (sens, CAGTCTTGCTGTATGTGATGG ; antisens, AAGCCTTACAGAAGCCGAAAA).

Etant donné le lien existant entre le développement des voies urinaires et génitales, des reins ont également été à prélevés différents stades. D'autres tissus (foie, intestin, bourgeons de membres) ont également servi à l'étude.

## 2) Inhibition du Nonsense-Mediated Decay (NMD) et extraction des ARN totaux

Nous avons, dans une expérience préliminaire, recherché parmi les lignées cellulaires disponibles au laboratoire, une ou plusieurs d'entre elles synthétisant la forme F, G ou H de *Tcf7l2*, et identifié les cellules de carcinome embryonnaire P19 comme un modèle adéquat. Celles-ci ont été ensemencées à raison de  $3 \cdot 10^5$  cellules par boîte de 100 mm de diamètre en milieu DMEM supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal. Après 24 heures de culture en étuve à 37°C + 5 % CO<sub>2</sub>, les inhibiteurs généraux de la traduction, cycloheximide ou puromycine, sont ajoutés au milieu de culture à une concentration finale de 50 µg/mL, inhibant le système du NMD qui dépend de la synthèse protéique (Carter *et al.*, 1995). Après 5 heures d'incubation en présence de ces inhibiteurs, les cellules sont collectées puis stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

Les ARN totaux sont extraits de ces cellules à l'aide du kit NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II selon les recommandations du fournisseur (Macherey-Nagel). L'intégrité des ARN totaux isolés est vérifiée par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1 % en présence de BET (Bromure d'ETHyidium) puis dosés par mesure de DO (Densité Optique) à une longueur d'ondes  $\lambda=260$  nm.

## 3) Protocoles de réverse-transcription

Deux protocoles de réverse-transcription ont été mis en œuvre au cours de cette étude, l'un à l'aide d'amorces spécifiques de *mTcf7l2*, l'autre utilisant des amorces aléatoires.

Pour l'étape de réverse-transcription « généralisée », une quantité de 1 µg d'ARN totaux est mise en présence d'amorces aléatoires hexanucléotidiques (Promega) à une concentration finale de 10 µM dans un volume final de 10 µL. Après dénaturation 5 minutes à 95°C, le mélange est incubé sur glace pendant 5 minutes, suivi d'une centrifugation à 13000 g pendant 5 minutes à +4°C. Cette solution est ensuite incubée pendant 1 h à 37°C en présence de 2,5 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), de 0,1 M de DTT (Dithiothréitol), de 1,5 unité (U) d'inhibiteur de ribonucléases (RNasin<sup>®</sup>, Promega), de 200 U de transcriptase inverse M-MLV<sup>®</sup> (Promega) et de sa solution tampon. Pour chaque réaction de synthèse d'ADNc à partir d'un échantillon d'ARN total, une réaction dans les mêmes conditions est réalisée en absence de transcriptase inverse et a valeur de contrôle négatif pour la réaction de PCR (RT-).

Les conditions réactionnelles de la réverse-transcription spécifique sont identiques à l'exception des amorces oligonucléotidiques utilisées. En effet, les amorces

hexanucléotidiques aléatoires sont remplacées par des amorces conçues de façon à ce qu'elles s'hybrident spécifiquement sur les ARNm de *mTcf7l2* (**Tableau 1**). La concentration de ces amorces spécifiques est de 50 nM dans le volume final réactionnel afin de permettre une reverse-transcription efficace mais d'éviter tout artefact d'amplification lors de la PCR.

**Tableau 1. Séquences nucléotidiques des amorces de reverse-transcription spécifiques du gène *mTcf7l2*.**

Séquence (5'-3') des amorces	Région ciblée
CCTGGGTGGCCTGACGCTG	Intron 9 (50 pb en aval de l'exon 9)
AGAGGACAACAGAGGAACGATGAT	Intron 9 (534 pb en aval de l'exon 9)
TCGCTTCAACCTCTGGATACGCA	Intron 9 (1,7 kb en aval de l'exon 9)
CAGCTCGTAGTATTTGCCTGTTC	Exon 12

Quatre amorces oligonucléotidiques de reverse-transcription spécifique ont été conçues pour cette analyse. Trois d'entre elles s'hybrident au sein de l'intron 9 de *mTcf7l2*, dans des régions de plus en plus distantes de l'extrémité 3' de l'exon 9. La détection des ADNc synthétisés est faite par PCR classique.

#### 4) Protocoles de PCR

Les amplifications par PCR classique sont réalisées selon le protocole suivant : les ADNc synthétisés sont amplifiés en présence de 200 nM de chaque amorce (sens et antisens), de 100 nM de chaque dNTP et de 2,5 U de GoTaq<sup>®</sup> DNA polymérase (Promega) dans le tampon de réaction adéquat. La réaction débute par une dénaturation initiale de 3 minutes à 95°C. Ensuite, 35 cycles de PCR [dénaturation 30 sec à 95°C, hybridation 30 sec à 62°C, élongation 2 min à 72°C] sont réalisés. Enfin, une étape d'élongation terminale à 72°C pendant 10 minutes permet d'achever toutes les élongations initiées. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % en TBE 1 X en présence de BET après une migration de 25 min à 100 V.

La PCR quantitative (PCRq) en temps réel est réalisée à l'aide du kit « *Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix* » selon les recommandations du fournisseur (Applied Biosystems). Chaque réaction de PCRq est effectuée en triplicatas sur des dilutions au 50<sup>ème</sup> des ADNc. Les amorces nucléotidiques servant à l'amplification ont été conçues de façon à quantifier

indépendamment ou non les ARNm encodant les isoformes de *mTcf712* pleine longueur ou tronquées de la boîte HMG. Un couple d'amorces pour le gène *HPRT1*, utilisé en tant que standard interne d'amplification, a également été déterminé (sens, GCTGGTGAAAAGGACCTCTCG ; antisens, GTCAAGGGCATATCCAACAACAAAC). L'abondance relative des ARNm de *mTcf712* est normalisée par rapport à ce standard interne via la méthode du  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Les séquences des amorces de PCR classique ou de PCR quantitative utilisées pour l'amplification spécifique des différents ARNm du gène *mTcf712* sont consignées dans le tableau ci-après.

**Tableau 2. Séquences nucléotidiques des amorces de PCR spécifiques du gène *mTcf712*.**

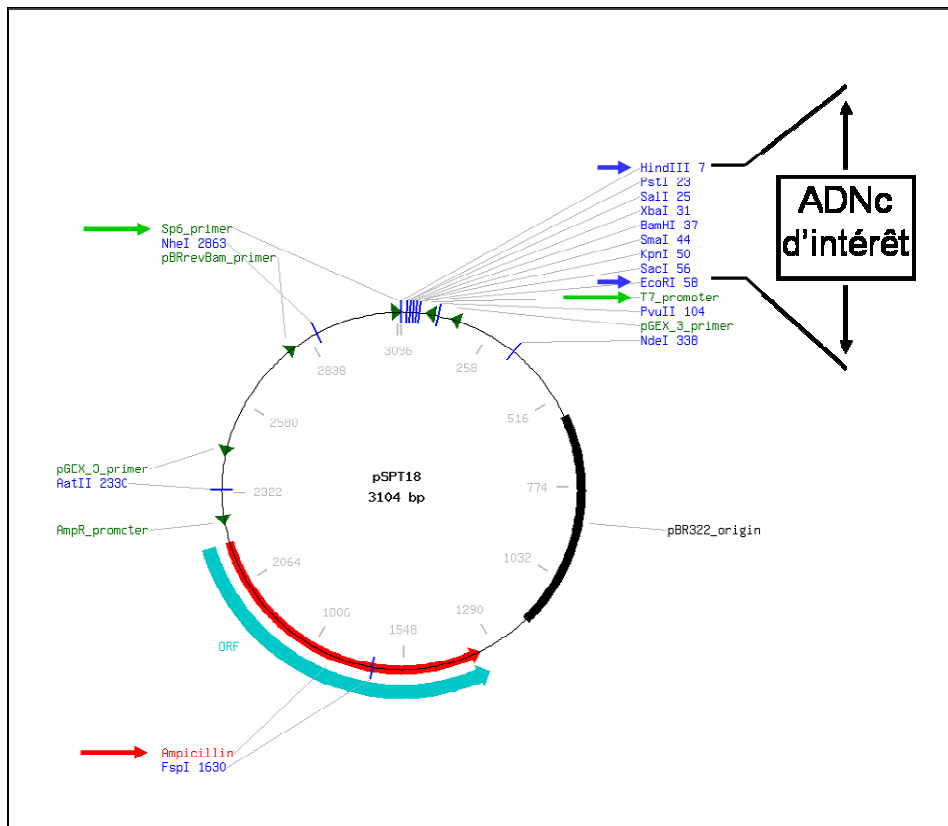
	Séquence (5'-3') des amorces	Région de <i>mTcf712</i> ciblée
<b>PCR</b>	ACTCACGCCTCTCATCACGTACAG (S)	exon 7
	GGCCTCACAAGAAGTCACAGCGACTC (AS)	exon 9
	CCCTCTCTGCTTCATTCCTCTC (S)	intron 9
	ATGGCTGCACTCTCTTTCAATGT (AS)	exon 11
<b>PCRq</b>	TCCTCGCTGGTCAATGAATC (S)	exon 1
	CCCTTAAAGAGCCCTCCATC (AS)	exon 3
	AGGTCAGCCTGTGTACCCAATC (S)	exon 9
	AGGGAACCTAGAGGACAGAAAGC (AS)	exon 10
	CACGACAGGAGGATTCAGACAC (S)	exon 9
CTAGAGGGCCTCACAAGAAGTCA (AS)	intron 9	

## 5) Hybridation *in situ* sur organes isolés

### 5-1) Préparation des organes isolés pour l'HIS

Après microdissection des tractus urogénitaux d'embryons au stade 12,5 *jpc* jusqu'à la naissance, les organes sont fixés 4 heures à +4°C sous agitation douce dans une solution de paraformaldéhyde 4 % en PBS 1X. Ils sont ensuite rincés par 2 bains d'1 heure en PBT (PBS-Tween 0,1 %) puis déshydratés par des bains successifs de 30 minutes en PBT-méthanol 25 %, 50 % et 75 % à température ambiante. Les organes fixés et déshydratés sont alors stockés à -20°C dans du méthanol 100 % jusqu'à utilisation.





**Figure 9. Carte du vecteur de clonage et de transcription pSPT18 utilisé pour la synthèse des ribosomes.** Les ADNc d'intérêt sont insérés dans le vecteur pSPT18 entre les sites de restriction HindIII et EcoRI du site multiple de clonage (flèches bleues). La transcription est effectuée par les ARN polymérases T7 ou SP6 permettant la synthèse respectivement des ribosomes sens et antisens.

## 5-2) Synthèse des ribosondes

L'hybridation *in situ* a été réalisée sur des tractus urogénitaux de souris mâles et femelles à l'aide de ribosondes froides synthétisées grâce au kit DIG RNA Labeling Kit SP6/T7 (Roche). Le vecteur de clonage et de transcription pSPT18 de ce kit a été digéré par les enzymes de restriction HindIII et EcoRI avant ligation avec les ADNc d'intérêt (**Figure 9**). Ces ADNc sont obtenus par RT-PCR à partir d'ARN totaux extraits de tractus génital femelle au stade 11,5 *jpc*, à l'aide d'amorces oligonucléotidiques dont les séquences figurent dans le tableau suivant.

**Tableau 3. Oligonucléotides utilisés pour l'amplification et le clonage des ADNc d'intérêt en vue de la synthèse des ribosondes.**

Ribosonde	Séquences des amorces sens (S) et antisens (A)	Taille de l'amplicon (pb)	Région de <i>mTcf7l2</i> ciblée
BCBD	CAGTCGAATTCGGAAAGGGATTTAGCCGATG (S) GCATGAAGCTTCGATCCGTTGGGGAGGTAG (A)	272	exons 1-2-3
Ex9Int9	CAGTCGAATTCAGACACCCCTACCCACAG (S) GCATGAAGCTTGCCTTCTTAAGTTGTGACTCTATG (A)	319	exon 9 intron 9
Int9	CAGTCGAATTCCTTGTGGTAATGGGGTGACAG (S) GCATGAAGCTTCATGTGGGCACGTATGATCT (A)	984	intron 9

(BCBD, Beta-Catenin Binding Domain ; Ex, Exon ; Int, Intron)

Les produits d'amplification obtenus par PCR à l'aide de ces amorces oligonucléotidiques contenant les sites de restriction HindIII (en vert) et EcoRI (en rouge) sont alors digérés par ces deux enzymes puis sous-clonés dans le vecteur pSPT18 préalablement digéré. La séquence en bleu dans les amorces de PCR permet d'assurer une digestion enzymatique efficace. Après sélection des plasmides recombinants, la synthèse des ribosondes proprement dite est effectuée à partir de 1 µg de plasmide linéarisé, selon les recommandations du fournisseur (Roche). La transcription *in vitro* par l'ARN polymérase T7 à partir des plasmides digérés par HindIII permet la synthèse des ribosondes sens. A l'inverse, la transcription *via* l'ARN polymérase SP6 des plasmides digérés par EcoRI fournit les ribosondes antisens. Les ribosondes synthétisées, marquées par la digoxygénine permettant leur détection immunologique, sont visualisées après une migration électrophorétique en gel d'agarose puis dosées à  $\lambda=260$  nm. Après précipitation, les ribosondes sont reprises dans un volume adéquat de tampon d'hybridation et stockées à -80°C.

## 5-3) Protocole expérimental d'HIS

Les tractus urogénitaux initialement conservés dans le méthanol 100% sont réhydratés

par des bains successifs de 5 min à +4°C en PBT contenant des concentrations décroissantes de méthanol (75 %, 50 % et 25 %), suivis par 4 lavages de 5 min dans du PBT à +4°C. Ils sont ensuite perméabilisés par un traitement à la protéinase K (4,5 µg/mL) dans du PBT pendant une durée fonction de la taille des pièces de dissection. A température ambiante, après 4 lavages de 5 min dans du PBT, ils sont placés dans une solution fixatrice pendant 15 min puis rincés 3 fois dans du PBT pendant 5 min. Ils sont ensuite lavés 3 min dans une solution de PBT contenant 50 % de solution d'hybridation puis 3 min dans 100 % de solution d'hybridation. Une étape de préhybridation est alors effectuée par incubation des tractus dans 900 µL de solution d'hybridation pendant 3 h à 65°C. Pour l'étape d'hybridation proprement dite, les organes isolés sont incubés dans 1 mL de solution d'hybridation contenant 200 ng/mL de ribosonde sens ou antisens pendant 12 heures à 65°C.

Après hybridation, les tractus urogénitaux sont lavés dans 800 µL de solution d'hybridation préchauffée (5 min, 65°C). Un volume de 400 µL de 2X SSC (0,3 M NaCl ; 0,03 M citrate de sodium) pH 7 est ensuite ajouté à trois reprises (5 min, 65°C). Ils sont alors lavés dans 2 bains d'une solution de 2X SSC pH 7 / 0,1 % CHAPS (1h, 65°C) puis dans 4 bains de tampon acide maléique (2 fois 10 min à température ambiante suivis de 2 fois 30 min à 65°C) et enfin dans 2 bains de 10 min de PBS suivis de 2 bains de 5 min de PBT à température ambiante. Ils sont finalement incubés dans le tampon de l'anticorps pendant 2 h à +4°C sous agitation douce puis dans le même tampon contenant l'anticorps anti-digoxigénine-AP (Roche) dilué au 1/5000<sup>ème</sup> pendant 12 h à +4°C sous agitation douce.

A l'issue de l'incubation, les tractus urogénitaux sont lavés à température ambiante 5 fois 45 min dans du PBT contenant 0,1 % de BSA. Le lavage se poursuit dans les mêmes conditions par 2 bains de 30 min de PBT puis par 2 bains de 10 min en tampon de révélation. La révélation est obtenue par incubation à température ambiante ou à 37°C dans une solution de BM-Purple (Roche), le substrat de la phosphatase alcaline couplée à l'anticorps. La durée de révélation est à adapter selon la température et la sonde utilisée. La réaction de coloration est arrêtée par 5 lavages successifs de 5 min dans du PBT contenant 1 mM d'EDTA. Ils sont ensuite placés dans une solution fixatrice pendant 3 h puis rincés 3 fois dans du PBT pendant 5 min. Enfin, ils sont déshydratés grâce à des bains successifs de 5 min de PBT contenant des concentrations croissantes de méthanol (25 %, 50 %, 75 %) suivis de 2 bains de méthanol 100 % à température ambiante. Ils peuvent alors être conservés à -20°C dans le méthanol 100 %.

La composition de l'ensemble des solutions utilisées pour ces expériences figure dans le tableau de la page suivante.

**Tableau 4. Composition des solutions utilisées pour l'hybridation *in situ* sur organes isolés.**

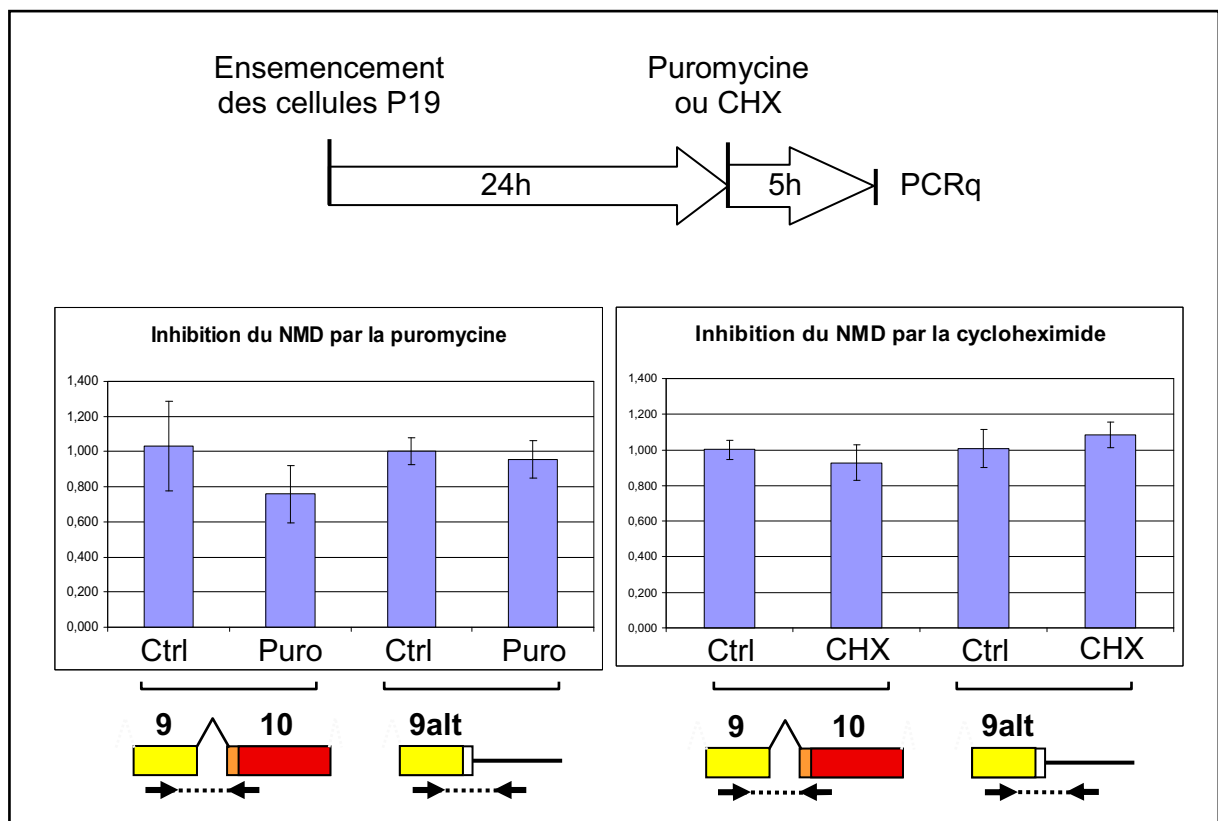
<b>PBS (pH 7,4)</b>				<b>20X SSC (pH 7)</b>	
NaCl	150 mM			NaCl	3 M
KCl	2,7 mM			Citrate trisodium dihydrate	0,3 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM			HCl 1 M	qsp pH 7
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	10 mM			<b>2X SSC / 0,1 % CHAPS</b>	
HCl 1 M	qsp pH 7,4			CHAPS	0,1 %
<b>PBS Tween (PBT)</b>				2X SSC	qsp volume désiré
Tween 20	0,1 %			<b>Tampon acide maléique</b>	
PBS	qsp volume désiré			Acide maléique	100 mM
<b>Solution de méthanol</b>				NaCl	150 mM
Méthanol 100%	75 %	50 %	25 %	HCl 1 M	qsp pH 7,5
	qsp	qsp	qsp		
PBT	volume	volume	volume		
	désiré	désiré	désiré		
<b>Protéinase K - PBS Tween</b>				<b>Tampon anticorps</b>	
Protéinase K (20 mg/mL)	4,5 µg/mL			Sérum de chèvre	10 %
PBT	qsp volume désiré			Blocking Reagent	1 %
<b>Solution fixatrice</b>				Tp acide maléique	qsp volume désiré
Paraformaldéhyde 20 %	4 %			<i>Filtrer à 0,45 µm sur glace</i>	
Glutaraldéhyde 25 %	0,2 %			<b>PBT / BSA 0,1 %</b>	
PBT	qsp volume désiré			BSA	0,10 %
<b>Solution d'hybridation</b>				PBT	qsp volume désiré
Blocking Reagent	1 g			<b>Tampon de révélation</b>	
Formamide	50 mL			Tris HCl pH 9,5	1 M
20X SSC pH 7	25 mL			NaCl	5 M
ARN de Torula (10 mg/mL dénaturé pendant 2 min à 65°C)	10 mL			MgCl <sub>2</sub>	0,5 M
Héparine (50 mg/mL)	200 µL				
Tween 20 20 %	500 µL				
CHAPS 10 %	1 mL				
EDTA 0,5 M	1 mL				
H <sub>2</sub> O	qsp 100 mL				
<i>Filtrer à 0,45 µm</i>					

#### 6) Extraction des protéines totales et western blot

Cette étude de l'expression spatio-temporelle des ARNm de *mTcf712* a été complétée par des expériences de western blot sur des extraits de protéines totales à partir de différents tissus embryonnaires. Les anticorps primaires utilisés sont des anticorps monoclonaux commerciaux (Cell Signaling Technology®) dirigés contre l'extrémité N-terminale des protéines mTcf712 ( $\alpha$ -TCF4 (C9B9)) ou contre la région C-terminale ( $\alpha$ -TCF4 (C48H11)). Ces anticorps monoclonaux ont été produits par immunisation de lapins avec de courts peptides synthétiques correspondant aux résidus voisinant l'acide aminé Glu81 (exon 2) pour l'anticorps C9B9, l'acide aminé Leu330 (exon 11) pour l'anticorps C48H11.

Les organes microdisséqués et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  sont repris par 50 à 150  $\mu\text{L}$  de tampon RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; NP40 1 % ; Déoxycholate de Na 1 %) en fonction de la taille des organes, tampon additionné d'un mélange d'inhibiteurs de protéases. Après broyage à l'aide d'un appareil de potter, les lysats sont soniqués puis centrifugés pendant 15 min à  $+4^{\circ}\text{C}$  à 13000 g. Les culots et les surnageants obtenus sont récupérés puis stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Le dosage des protéines hydrosolubles présentes dans les surnageants est réalisé grâce au kit « Bicinchoninic Acid Protein Assay » (Sigma-Aldrich) selon le protocole recommandé.

Avant migration électrophorétique dans un gel SDS-PAGE 10,5 %, entre 30 et 50  $\mu\text{g}$  de protéines totales de chaque échantillon sont repris dans du tampon de Laemmli 2X (Tris-HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 4 % ; Glycérol 20 % ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 2 % ; Bleu de bromophénol 0,02 %) et dénaturées pendant 5 min à  $95^{\circ}\text{C}$  avant dépôt sur gel. Un marqueur de poids moléculaire (Prestained Marker Broad Range P7708S, New England Biolabs) migre en parallèle des échantillons. Après 2 heures de migration à 110 V, les protéines sont transférées pendant 1h15 à 90 V sur membrane de nitrocellulose (Millipore) pour le western blot. Les membranes récupérées sont incubées pendant 1h à température ambiante et sous agitation dans une solution de blocage PBS-lait 5 % puis 1h30 dans cette même solution additionnée des anticorps primaires C9B9 ou C48H11 dilués au 1000<sup>ème</sup>. Après 5 rinçages de 5 min chacun à température ambiante dans une solution de PBT-Lait 5 %, elles sont incubées 1h30 en présence de l'anticorps secondaire (anti-lapin couplé à la peroxydase) dilué au 20000<sup>ème</sup> dans la même solution. Enfin, les membranes sont à nouveau rincées par 5 bains de PBT de 5 min chacun puis par 3 bains de PBS de 10 min à température ambiante avant détection chimioluminescente (ECL<sup>TM</sup> Plus Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare).



**Figure 10. Les ARNm de *mTcf712* ne sont pas des substrats du système de dégradation du NMD.** La quantification relative des ARNm de *mTcf712* ne montre aucune accumulation des transcrits en présence de puromycine ou de cycloheximide, suggérant que les ARNm encodant les isoformes protéiques pleine longueur ou tronquées (sans domaine de liaison à l'ADN) ne sont pas sujets au NMD. Ctrl, Contrôle ; Puro, Puromycine ; CHX, Cycloheximide.

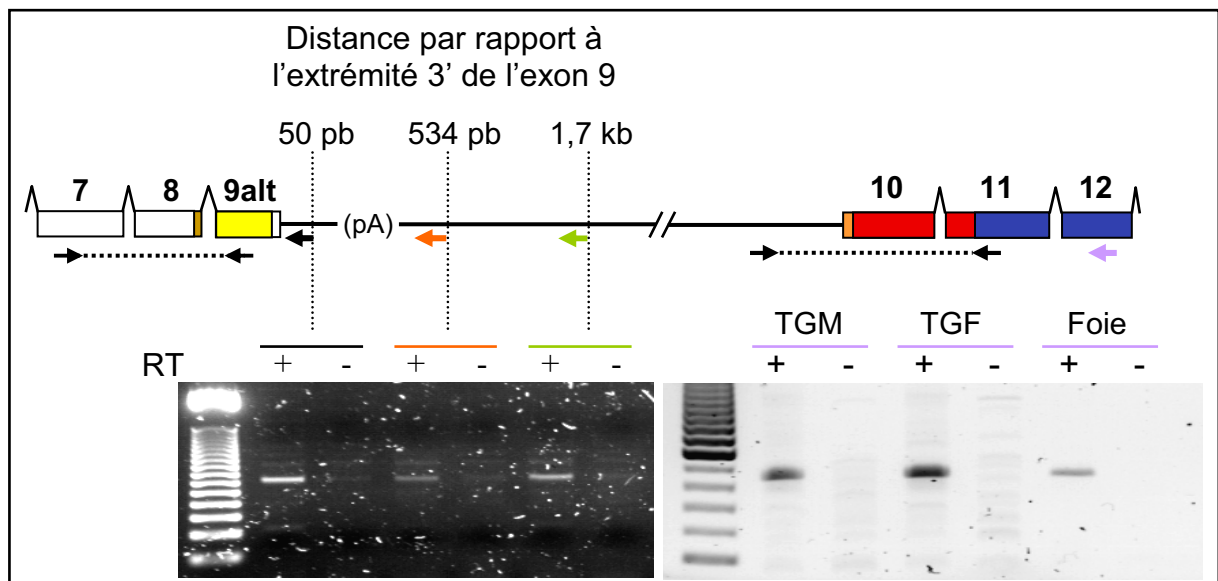
## B) Résultats

### 1) Etude de la stabilité des ARNm de *mTcf712*

Préalablement à l'analyse de l'expression spatio-temporelle du gène *mTcf712* au cours du développement urogénital, les premières expériences ont consisté à s'assurer de la stabilité des variants d'épissage de *mTcf712* décrits auparavant. La séquence des ARNm alternatifs de *mTcf712* isolés lors du crible différentiel par DDRT-PCR montre la présence d'un codon de terminaison de la traduction immédiatement en aval de l'exon 9 (voir plus bas), prédisant la synthèse de protéines tronquées mais pouvant également provoquer leur dégradation prématurée *via* le système du Nonsense-Mediated Decay (NMD). En effet, l'apparition au sein d'ARNm d'un codon stop reconnu comme aberrant par la cellule déclenche la reconnaissance et la dégradation de ces ARNm par ce mécanisme de surveillance, empêchant la synthèse de protéines anormales potentiellement délétères pour la cellule (Behm-Ansmant *et al.*, 2007).

Bien que des études fonctionnelles sur ces protéines aient déjà été rapportées dans la littérature, aucune n'a jusqu'à présent démontré que ces ARNm alternatifs de *mTcf712* ont pour raison d'être d'encoder des protéines ne conservant que le domaine de liaison à la  $\beta$ -caténine, et non de réprimer la synthèse des isoformes pleine longueur de *mTcf712* par un mécanisme post- ou co-transcriptionnel impliquant la dégradation de leur ARN par le système du NMD au moment de leur maturation.

Cette expérience d'inhibition pharmacologique du système de dégradation du NMD montre que les niveaux d'expression des deux classes d'ARNm de *mTcf712* qui nous intéressent, *i.e.* encodant les isoformes pleine longueur ou celles dépourvues de boîte HMG, demeurent constants quelles que soient les conditions expérimentales de culture (**Figure 10**). Cette observation, indiquant qu'aucun ARNm de ce gène ne semble être un substrat de ce mécanisme de dégradation, nous permet donc d'exclure la possibilité d'un mécanisme de régulation post- ou co-transcriptionnelle menant à une diminution de la synthèse de protéines pleine longueur par ciblage d'ARN non maturés vers le système du NMD. Il est ainsi très probable que les ARNm alternatifs de *mTcf712* identifiés encodent bel et bien des isoformes conservant un domaine de liaison à la  $\beta$ -caténine mais sans domaine HMG de liaison à l'ADN. Leur rôle de dominant négatif vis-à-vis des formes longues, décrit *in vitro*, pourrait alors refléter une réalité biologique et avoir une fonction essentielle dans les processus de différenciation cellulaire.



**Figure 11. La synthèse des isoformes de mTcf7l2 dépourvues de domaine de liaison à l'ADN pourrait impliquer un phénomène de rétention de l'intron 9.** La reverse-transcription à l'aide d'amorces s'hybridant dans l'intron 9 de *mTcf7l2* a permis la détection par PCR d'ADNc synthétisé, quelle que soit la distance séparant l'extrémité 3' de l'exon 9 de la région ciblée par l'amorce de reverse-transcription (gel de gauche). Par ailleurs, la reverse-transcription avec une amorce spécifique de l'exon 12 a également permis d'amplifier un ADNc comprenant une partie de l'extrémité 3' de l'intron 9 (gel de droite). Ces résultats indiquent que l'intron 9 pourrait être retenu dans les ARNm codant pour les formes tronquées de *mTcf7l2*. Par ailleurs, l'expression de ces transcrits semble être plus faible dans le foie au stade 14,5 *jpc* que dans le tractus génital mâle (TGM) ou femelle (TGF) au même stade. pA, poly(A) génomique.



Par ailleurs, la séquence en nucléotides de la 3'UTR (3' Untranslated Region) des ARNm correspondant à ces isoformes F, G et H de *mTcf712* présente des caractéristiques propres à la traduction. La séquence nucléotidique est la suivante :

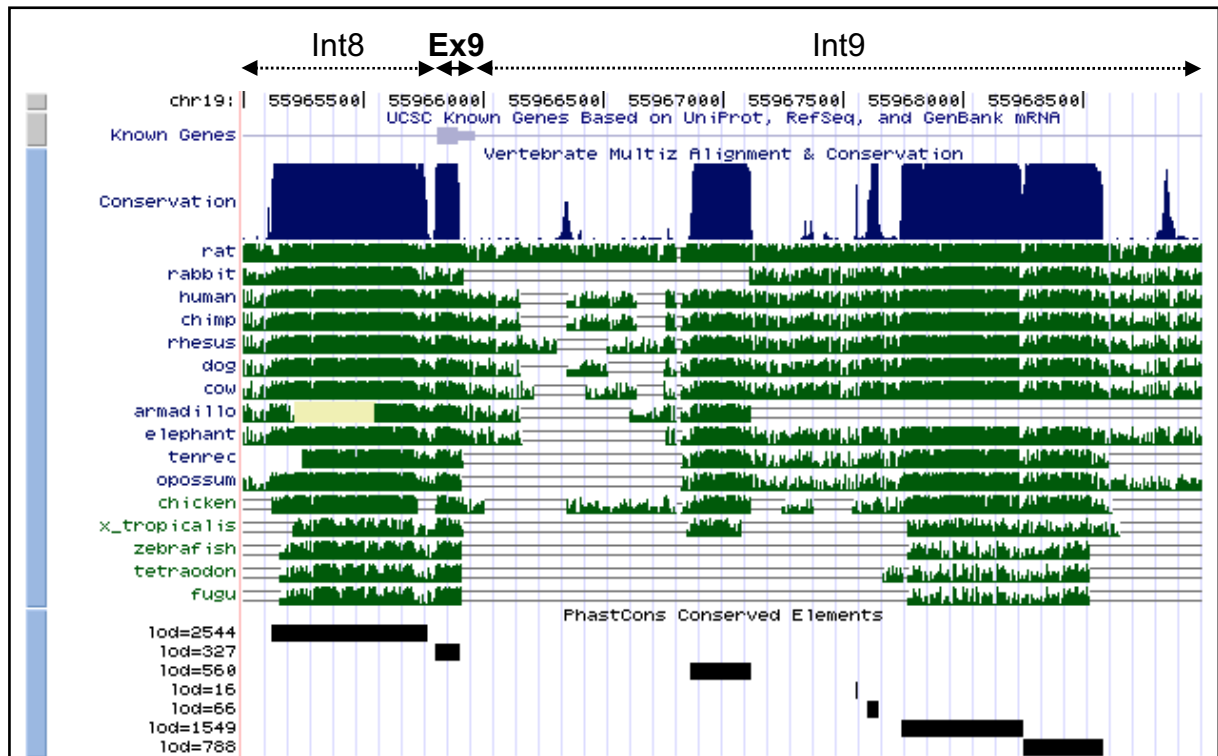
```
GGAACCAATCACGACAGGAGGATTCAGACACCCCTACCCACAGCGCTGACAGTCAACGCAT  
CTATGTCTAGG(TGA)gtcgctgtgacttcttgtgaggccctctagacagcgtcaggccacca  
ggcctgtggacatgtgcggtataataataataaaccactgttcattagtccttactcctaa  
aaaaaaaaaaaa
```

L'existence en aval de l'exon 9 (en rouge) d'un codon stop (TGA) et d'un signal de polyadénylation (tataaa) proche du motif consensus AATAAA renforce l'hypothèse selon laquelle les transcrits isolés indépendamment par l'équipe de Douglas (Douglas *et al.*, 2001) et la nôtre ne correspondent pas à des ARN pré-messagers partiellement maturés mais sont bien le résultat d'un événement régulé d'épissage alternatif conduisant à la synthèse de protéines tronquées à leur extrémité C-terminale.

## 2) Hypothèse d'un mécanisme transcriptionnel générant les ARNm alternatifs de *mTcf712* encodant les protéines dépourvues de boîte HMG

La synthèse des isoformes protéiques de *mTcf712* tronquées du domaine HMG repose ainsi sur un processus d'épissage alternatif menant à l'utilisation d'un codon de terminaison de la traduction immédiatement en aval de l'extrémité 3' de l'exon 9. Une autre particularité de la 3'UTR de ces ARNm est la présence à leur extrémité 3' d'une séquence poly(A). Curieusement, cette séquence est retrouvée à l'identique dans la séquence génomique et n'est donc vraisemblablement pas liée au mécanisme de polyadénylation des ARNm assurant leur stabilité. La caractérisation initiale de ces ARNm par criblage différentiel et leur sous-clonage ayant été réalisés à l'aide d'amorces oligo(dT), il est possible que cette succession d'adénines ait induit un biais expérimental dans la définition de l'extrémité réelle de cette 3'UTR.

Afin d'étudier cette possibilité d'une 3'UTR plus longue que celle répertoriée dans les bases de données, des expériences de RT-PCR ont été mises en œuvre à l'aide de différentes amorces de reverse-transcription spécifiques de l'intron 9 de *mTcf712* et s'hybridant à des distances de plus en plus importantes de l'extrémité 3' de l'exon 9. Ces expériences, réalisées à partir d'ARN totaux issus de tractus génitaux de souris mâle et femelle à 14,5 jours de gestation ainsi que de foie embryonnaire au même stade de développement, ont systématiquement permis de détecter les produits de PCR attendus, quelle que soit l'amorce spécifique utilisée pour la synthèse des ADNc (**Figure 11**). De la même façon, la reverse-



**Figure 12. Les régions introniques flanquant l'exon 9 contiennent des éléments de séquences évolutivement très conservés entre Vertébrés.** L'analyse sur le serveur UCSC Genome Browser des séquences introniques encadrant l'exon 9 révèle un fort degré de conservation évolutive de certaines régions non codantes immédiatement en amont de l'exon 9 et au sein de l'intron 9. Leur implication dans les mécanismes de régulations transcriptionnelles et/ou post-transcriptionnelles de *mTcf7l2* reste à démontrer. Int, Intron ; Ex, Exon.

transcription effectuée avec une amorce spécifique de l'exon 12, suivie d'une amplification par PCR à l'aide d'une amorce sens interne à l'intron 9 et d'une amorce antisens s'hybridant dans l'exon 11, a également permis l'obtention d'un produit de PCR. Ces deux observations suggèrent que les ARNm encodant les formes tronquées F, G et H de *mTcf7l2* sont sujets à un mécanisme particulier de régulation de l'épissage alternatif entraînant la rétention de l'intron 9. Cependant, aucun ADNc correspondant à l'un de ces ARNm et contenant la séquence entière de cet intron retenu n'a pu être cloné à partir d'ARN totaux isolés de tractus génitaux mâle ou femelle, ni d'aucun autre tissu. On constate en outre que le niveau d'expression de ces ARNm alternatifs est plus élevé dans les tractus génitaux mâle et femelle en cours de différenciation que dans le foie embryonnaire à stade équivalent (14,5 *jpc*). Cette observation renforce l'idée selon laquelle les variants d'épissage du gène *mTcf7l2* jouent un rôle important au cours du développement embryonnaire, notamment au niveau des voies génitales internes mâle et femelle.

Notre hypothèse d'une régulation de l'épissage alternatif conduisant à la rétention de l'intron 9 puis à la synthèse d'isoformes de *mTcf7l2* dénuées de boîte HMG nous a poussé à étudier dans le détail la séquence de l'intron 9 dans les bases de données disponibles. Une analyse du gène *mTcf7l2* sur le serveur UCSC Genome Browser (University of California Santa Cruz ; <http://genome.ucsc.edu/>) nous a permis de constater que les régions introniques encadrant l'exon 9 contiennent des éléments de séquences non codants particulièrement conservés au cours de l'évolution (**Figure 12**). Au vu de ces résultats, l'existence d'une relation fonctionnelle entre ces séquences très conservées et le phénomène de rétention de l'intron 9 semble possible.

En résumé, cette analyse moléculaire préliminaire portant sur les ARNm de *mTcf7l2* tend à montrer que les ARNm alternatifs identifiés lors du criblage initial, qui ne sont pas des substrats du système de dégradation du NMD, permettraient la synthèse de protéines sans domaine de liaison à l'ADN mais conservant un domaine de liaison à la  $\beta$ -caténine, pouvant alors exercer un effet dominant négatif vis-à-vis des isoformes pleine longueur de *mTcf7l2* par un mécanisme d'inhibition compétitive. Le mécanisme post- ou co-transcriptionnel aboutissant à la synthèse de ces protéines tronquées pourrait impliquer un phénomène de rétention d'intron comprenant des éléments de séquences très conservés d'un point de vue évolutif, sans qu'un lien fonctionnel n'ait été encore établi entre ces deux conditions.

Après ces premières expériences confirmant l'existence de variants d'épissage traductibles du gène *mTcf7l2* encodant des protéines tronquées susceptibles de rompre l'interaction entre

la  $\beta$ -caténine et les isoformes pourvues de boîte HMG, nous avons cherché à identifier, par RT-PCR puis séquençage, quels ARNm sont exprimés au sein de différents tissus du tractus urogénital de souris à différents stades du développement. Leur profil d'expression spatio-temporel a ensuite été établi au cours du développement sexuellement dimorphique du tractus génital murin, d'abord par PCR quantitative puis par hybridation *in situ* sur organes isolés.

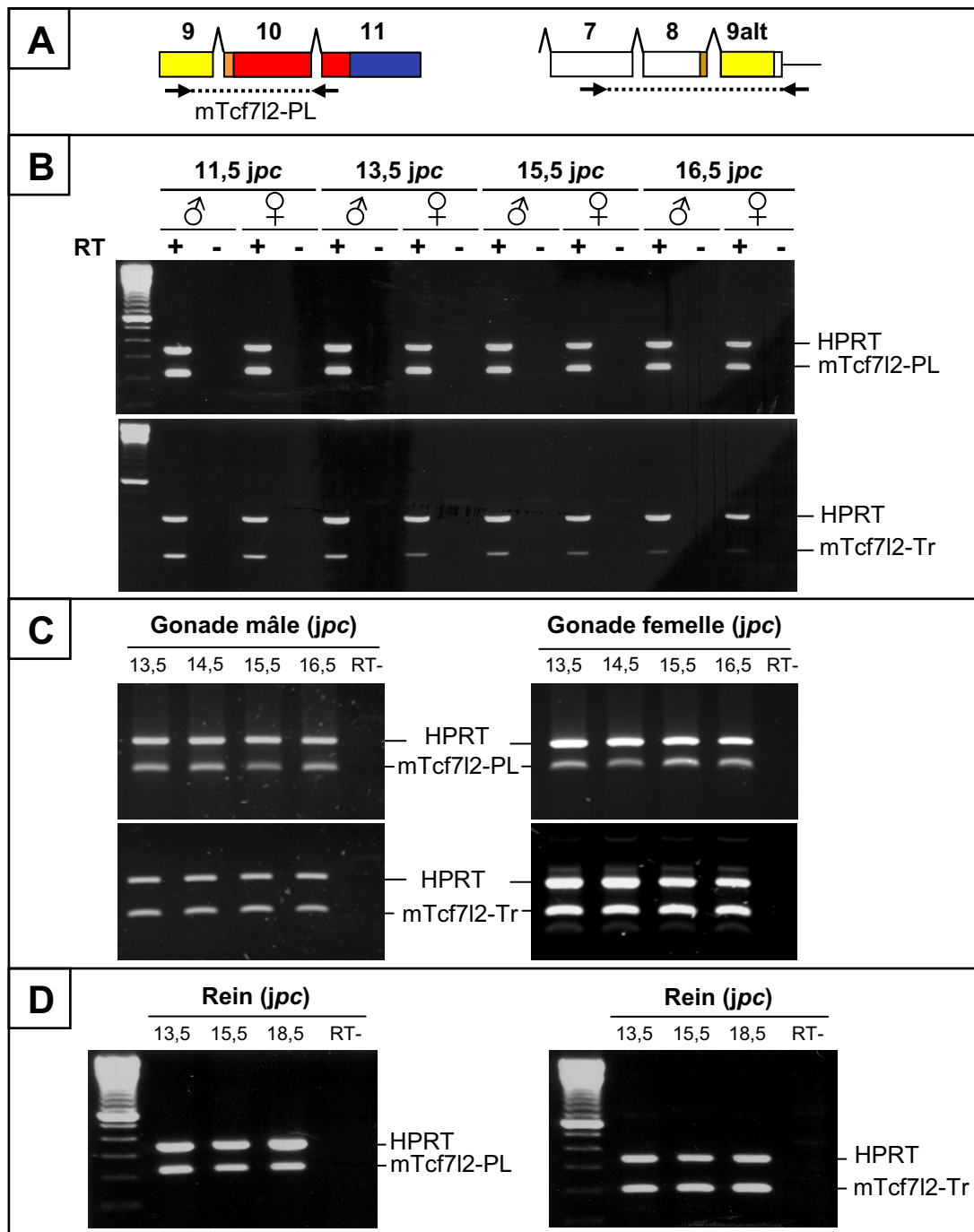
### 3) Détermination du profil d'expression spatio-temporel de *mTcf712* au cours du développement du tractus reproducteur mâle et femelle chez la souris

L'analyse de l'expression du gène *mTcf712* au sein de différents tissus embryonnaires et à différents stades de l'embryogenèse a d'abord été réalisée par RT-PCR classique au cours du développement des voies génitales internes mâle et femelle ainsi qu'au cours de la différenciation gonadique. Son expression dans le rein a également été explorée du stade 13,5 au stade 18,5 *jpc*, étant donné ses rapports étroits avec le tractus reproducteur au cours du développement.

#### 3-1) Etablissement du profil d'expression de *mTcf712* par RT-PCR et RT-PCRq

L'étude par RT-PCR du niveau d'expression du gène *mTcf712* au cours de la mise en place et de la différenciation de la sphère urogénitale chez la souris a été réalisée sur des extraits d'ARN totaux reverse-transcrits à l'aide d'amorces spécifiques. La PCR est effectuée avec des oligonucléotides permettant de discriminer les ADNc correspondant aux formes de *mTcf712* dépourvues de boîte HMG (*mTcf712*-Tr), de ceux correspondant aux formes pleine longueur (*mTcf712*-PL). Les PCR sont réalisées en duplex, HPRT servant de référence interne d'amplification.

Avant de réaliser ces profils d'expression, le séquençage des produits de PCR obtenus a permis de confirmer qu'ils correspondaient bien à des variants d'épissage du gène *mTcf712*. Ainsi, les ARNm *mTcf712*-G et -H ont été retrouvés dans le tractus génital mâle et femelle aux stades 13,5 et 15,5 *jpc* ; en revanche, *mTcf712*-F n'a pu être cloné à partir des différents tissus explorés. Pour les isoformes pleine longueur, le séquençage des produits de PCR a montré que les ADNc majoritairement amplifiés dans ces mêmes tissus correspondent bien à un ARNm de *mTcf712* encodant le domaine HMG de liaison à l'ADN et dénué de motif SxxSS modulateur de l'activation de la voie Wnt (Cf. **Figure 7**). Un profil exhaustif des différents ARNm de *mTcf712* exprimés au cours du développement du tractus urogénital n'a cependant pas été établi.



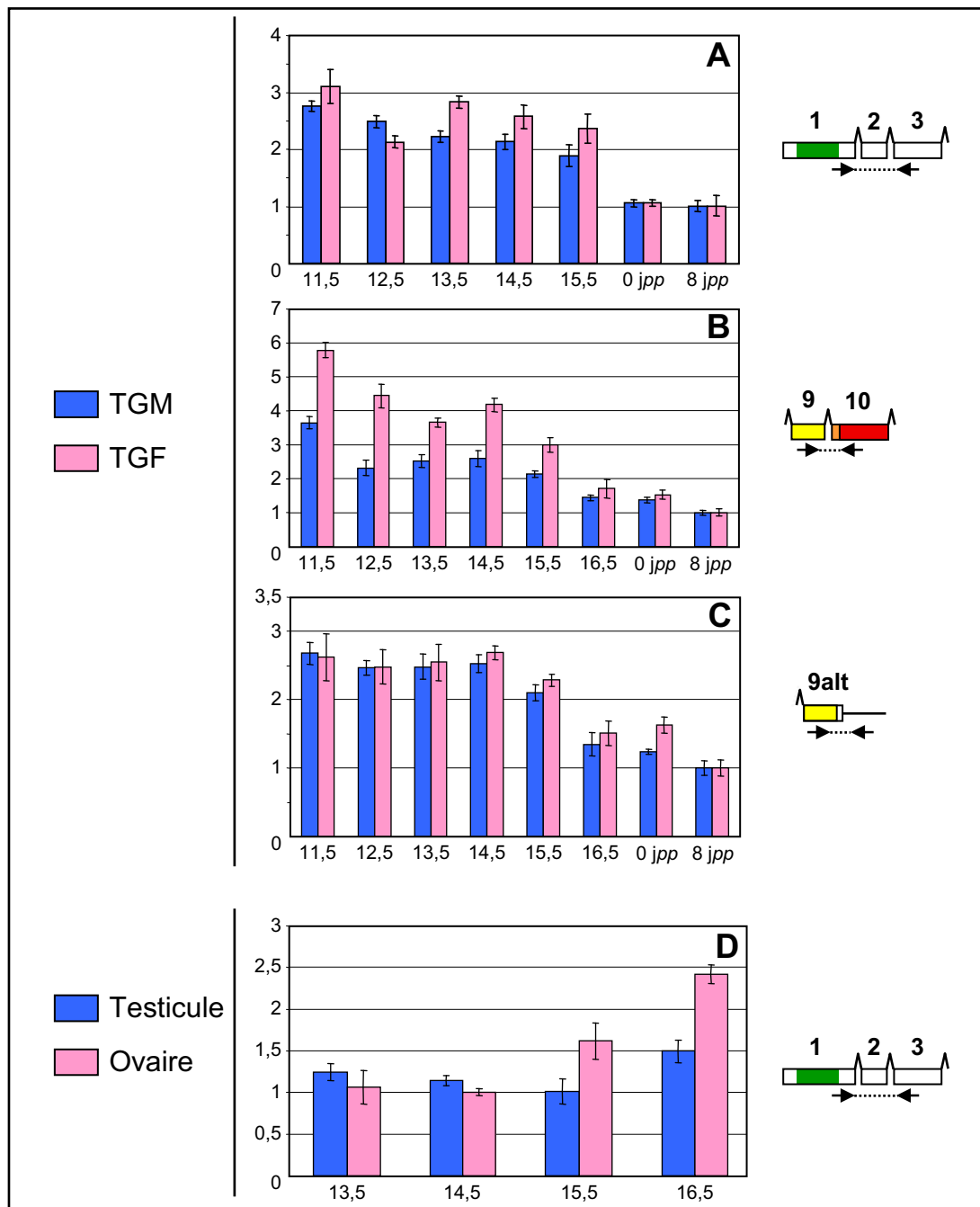
**Figure 13. Profils d'expression du gène *mTcf712* au cours du développement du tractus urogénital de souris obtenus par RT-PCR.** A) Schéma des régions amplifiées par PCR permettant de distinguer les ADNc encodant les protéines pleine longueur de *mTcf712* (mTcf712-PL) de ceux codant pour les isoformes sans boîte HMG (mTcf712-Tr). B) La quantification des ARNm mTcf712-PL semble montrer une expression relativement constante au cours du développement et de la différenciation des voies génitales internes dans les deux sexes, alors que les formes mTcf712-Tr voient leur expression diminuer jusqu'à être presque indétectable à 16,5 jpc. Aucune expression sexuellement dimorphique n'est constatée. C) La même expérience menée au cours de la différenciation des gonades révèle une expression stable des 2 classes de transcrits et ne montre pas non plus de différence notable entre mâle et femelle. D) Les formes mTcf712-PL et -Tr sont également détectées dans le rein embryonnaire.

Les résultats obtenus par cette première approche montrent que les ARNm mTcf712-PL sont exprimés au cours de la différenciation des ébauches embryonnaires du tractus génital, tant chez les embryons mâles que femelles (**Figure 13**). L'expression de cette classe d'ARNm semble par ailleurs peu dynamique, son niveau apparaissant relativement constant entre 11,5 *jpc* et 16,5 *jpc*. En ce qui concerne les ARN mTcf712-Tr encodant les formes tronquées de mTcf712, ils sont également détectés dès le stade 11,5 *jpc* mais leur expression semble décroître rapidement lors du processus de différenciation des voies génitales internes, quel que soit le sexe. D'une façon similaire, la quantification de ces deux classes d'ARNm dans les gonades mâle et femelle entre les stades 13,5 et 16,5 *jpc* montre un niveau d'expression apparemment stable au cours de la différenciation gonadique précoce, sans distinction de sexe. Enfin, nous avons pu constater que les ARNm mTcf712-PL et mTcf712-Tr sont aussi exprimés dans le rein à différents stades embryonnaires et à niveau sensiblement constant.

Aucun dimorphisme sexuel n'a donc pu être observé dans la dynamique ou le niveau d'expression des ARNm codant pour les formes pleine longueur ou tronquées de *mTcf712*, ni au cours de la différenciation du tractus génital interne ni au cours de la différenciation gonadique précoce.

Etant donné le caractère peu quantitatif de la RT-PCR, et afin de gagner en précision dans la quantification relative de ces différents variants d'épissage lors du développement du tractus reproducteur, leur profil d'expression a été établi par RT-PCR quantitative dans le tractus génital du stade 11,5 *jpc* au stade 8 *jpp*, ainsi que dans les gonades du stade 13,5 au stade 16,5 *jpc*. Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification, conçus de manière à quantifier indépendamment les ARNm mTcf712-PL et mTcf712-Tr, sont ceux utilisés dans l'expérience précédente d'inhibition du NMD. Un couple d'amorces oligonucléotidiques visant les exons 1 et 3 de *mTcf712*, *i.e.* ciblant le domaine d'interaction avec la  $\beta$ -caténine, a également été utilisé pour apprécier le niveau de transcription générale de ce gène *via* la quantification de l'ensemble de ses ARNm.

Comme précédemment, l'abondance relative des différents ARNm ciblés est normalisée par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta CT}$  par rapport à HPRT considéré invariant.



**Figure 14. Quantification par RT-PCRq du niveau d'expression des différentes classes d'ARNm de *mTcf7l2* dans le tractus reproducteur en différenciation.** A) L'amplification de l'ensemble des transcrits de *mTcf7l2* à l'aide d'un couple d'amorces ciblant les exons 1 et 3 montre une diminution globale de leur expression dans le tractus génital mâle (TGM) et femelle (TGF), du stade 11,5 jpc jusqu'à 8 jours après la naissance, sans qu'aucun dimorphisme sexuel ne soit constaté. B) L'expression des ARNm *mTcf7l2*-PL est également décroissante dans les deux sexes, le niveau d'expression semblant légèrement supérieur chez la femelle jusqu'au stade 16,5 jpc. C) La quantification spécifique des ARNm encodant les isoformes de *mTcf7l2* sans boîte HMG ne révèle pas non plus d'expression sexuellement dimorphique lors du développement et de la différenciation du tractus génital. En revanche, leur expression semble diminuer plus tardivement que les ARNm codant pour les formes pleine longueur, et ce, dans les deux sexes. D) Finalement, la quantification de tous les ARNm de *mTcf7l2* dans les gonades mâle et femelle montre une hausse de leur expression uniquement dans l'ovaire en cours de différenciation.

La description du profil d'expression du gène *mTcf712* par RT-PCRq sur tout ou partie de ses ARNm nous a permis d'observer que les deux classes d'ARNm mTcf712-PL et -Tr définies auparavant voient leur expression diminuer au cours de la différenciation des voies génitales internes mâles et femelles, jusqu'à atteindre un minimum à la naissance (**Figure 14**). Cette diminution apparaît sensiblement plus tardive pour les ARNm codant pour les isoformes dépourvues de boîte HMG, leur expression demeurant stable jusqu'à 14,5 *jpc* dans les deux sexes. On note par ailleurs un niveau d'expression des ARNm mTcf712-PL visiblement supérieur dans le tractus génital femelle que dans le tractus génital mâle, entre les stades 11,5 et 15,5 *jpc*.

A l'instar des résultats précédents de RT-PCR, aucune expression sexuellement dimorphique n'a pu être constatée au cours de la mise en place et de la différenciation du tractus génital. En revanche, la quantification de l'ensemble des transcrits de *mTcf712* sur les testicules et les ovaires du stade 13,5 à 16,5 *jpc* montre une augmentation du taux de transcription de ce gène uniquement lors de la différenciation ovarienne précoce, suggérant un rôle de *mTcf712* dans le développement gonadique femelle. Des expériences de RT-PCRq complémentaires (non présentées) ont montré que cette augmentation de l'expression de *mTcf712* dans les gonades femelles concerne les deux classes d'ARNm de ce gène.

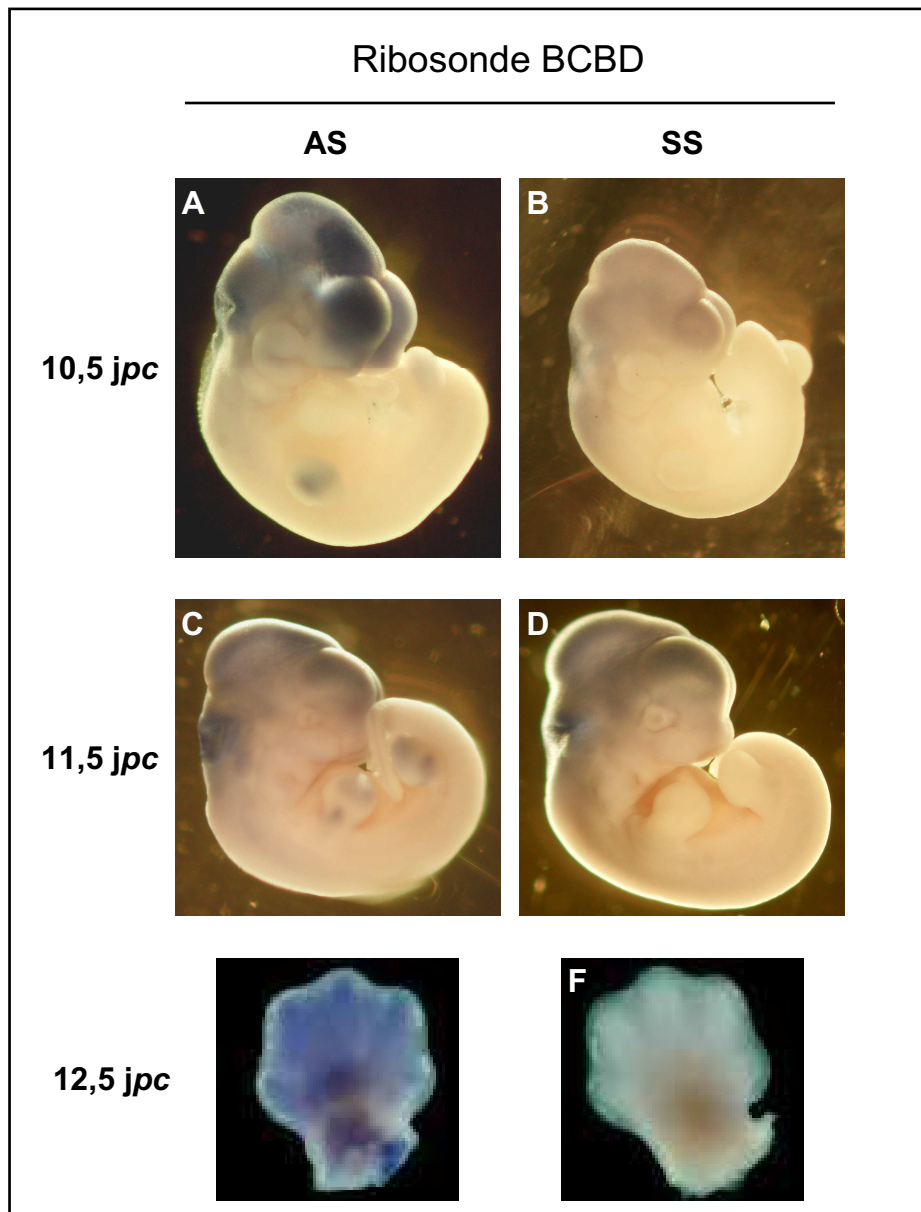
L'analyse de l'ensemble des données de PCRq nous a également permis de constater que le niveau d'expression globale des ARNm codant pour les protéines pleine longueur de mTcf712 est supérieur à celui des ARNm encodant les isoformes dépourvues de boîte HMG, quels que soient le stade, le tissu ou le sexe étudiés. Etant donné leur profil d'expression respectif, il est possible qu'un équilibre précisément régulé existe, en termes d'abondance, entre formes longues et courtes de mTcf712, régulant dans un sens ou dans l'autre la transcription de gènes cibles dans les cellules qui les co-expriment.

L'ensemble de ces observations sur la dynamique d'expression de *mTcf712* au cours du développement du tractus reproducteur n'a pas permis de décrire d'expression dimorphique entre mâle et femelle lors du développement des voies génitales internes. Seules les gonades en différenciation sont ainsi apparues comme le siège d'une expression divergente en fonction du sexe. Cette observation est difficilement conciliable avec notre hypothèse initiale d'un rôle des formes tronquées de mTcf712 dans le mécanisme de régression des canaux müllériens, puisque aucun pic d'expression des ARNm correspondants n'a été constaté dans le tractus génital mâle entre les stades 13,5 et 15,5 *jpc* (fenêtre temporelle de régression des canaux de Müller chez la souris). Hormis une amplification artefactuelle, peu probable, au cours du



DDRT-PCR (faux-positif), cette apparente contradiction avec les résultats issus du criblage différentiel peut s'expliquer par la différence des systèmes étudiés dans ces deux expériences : mâle vs femelle en RT-PCRq, femelle soumis ou non à l'action de l'AMH en DDRT-PCR. En effet, l'observation initiale d'un ARNm alternatif de *mTcf712* surexprimé en culture organotypique de mésonéphros femelle exposé à l'AMH correspond à une situation particulière où les canaux de Wolff ainsi que les canaux de Müller régressent. Cette expression différentielle pourrait donc être la conséquence de cette « double régression » simultanée des ébauches embryonnaires des tractus mâle et femelle, suggérant qu'il existe *in vivo* un mécanisme moléculaire minimum commun à la régression de ces deux types de canaux, et auquel participent les isoformes tronquées de *mTcf712*. Cette hypothèse est cependant assez improbable, étant admis que l'absence d'androgènes est suffisante pour que les canaux de Wolff dégénèrent. Une seconde explication voudrait que la détection de cet ARNm différentiellement exprimé sous l'action de l'AMH soit liée à un effet de cette hormone sur les gonades, présentes dans la culture organotypique de mésonéphros et non au processus de régression des canaux de Müller. Cet aspect sera abordé plus amplement dans la partie Discussion concluant cette partie.

Après cette étude quantitative de l'expression temporelle du gène *mTcf712* au cours de la mise en place et de la différenciation des systèmes génitaux mâle et femelle, la caractérisation de son profil d'expression a été complétée par des expériences d'hybridation *in situ* sur des tractus urogénitaux de souris prélevés à différents stades du développement.



**Figure 15. Validation de la ribosonde BCBD par HIS sur embryons entiers.** Cette première analyse par HIS à l'aide de la sonde BCBD montre un marquage spécifique des bourgeons de membres inférieurs et supérieurs aux stades 10,5 et 11,5 jours de gestation (A, C). A 12,5 *jpc*, les territoires présomptifs des futurs doigts sont également spécifiquement marqués (E). La spécificité de ces signaux est confirmée par l'absence de marquage des embryons hybridés avec la ribosonde sens (B, D, F). AS, sonde AntiSens ; S, sonde Sens.

### 3-2) Caractérisation du profil d'expression spatio-temporel de *mTcf7l2* par HIS sur tractus urogénitaux isolés

Afin d'obtenir des informations sur les territoires d'expression de *mTcf7l2* au sein du tractus urogénital en développement, des expériences d'HIS sur organes isolés ont été menées à l'aide de différentes ribosondes marquées par la digoxygénine (Cf. **chapitre II-A-5-2**) : « BCBD » ( $\beta$ -Catenin-Binding Domain) couvrant les trois premiers exons de *mTcf7l2*, « Ex9Int9 » ciblant l'exon 9 et le début de la 3'UTR des ARNm encodant les isoformes dénuées de domaine d'interaction avec l'ADN, et « Int9 » s'hybridant au milieu de l'intron 9 supposé retenu.

Avant l'exploration de la distribution spatiale des ARNm de *mTcf7l2* au cours du développement urogénital, une première expérience d'HIS a été réalisée sur des embryons entiers, prélevés entre 10,5 et 12,5 jours de gestation, et hybridés avec chacune des trois ribosondes d'intérêt. Comme le montre la figure ci-contre (**Figure 15**), un marquage spécifique des bourgeons de membres aux stades 10,5 et 11,5 *jpc*, ainsi que des futurs doigts au stade 12,5 *jpc*, est observé après hybridation avec la sonde BCBD. Le marquage visible au niveau de la tête ne semble pas significatif, la coloration observée comparable entre les ribosondes sens et antisens reflétant leur fixation de manière aspécifique sur les embryons. Aucune des ribosondes Ex9Int9 et Int9 n'ont, quant à elles, permis la détection d'un marquage spécifique sur ces embryons (données non présentées).

Ces résultats préliminaires confirment des observations antérieures rapportant l'expression de *mTcf7l2* dans les bourgeons de membres (Cho and Dressler, 1998) et nous permettent, par conséquent, d'attester de la spécificité de la ribosonde BCBD antisens vis-à-vis des ARNm de *mTcf7l2*.

Après cette étape préalable de validation, la description des régions d'expression du gène *mTcf7l2* lors de la mise en place et de la différenciation du tractus urogénital mâle et femelle a été réalisée du stade 12,5 *jpc* jusqu'à 1 jour après la naissance. Les séries de photos qui suivent présentent les résultats expérimentaux obtenus au cours de cette étude, la première planche correspondant aux HIS sur tractus urogénitaux femelles (**Figure 16a**), la seconde à leur équivalent chez le mâle (**Figure 16b**).

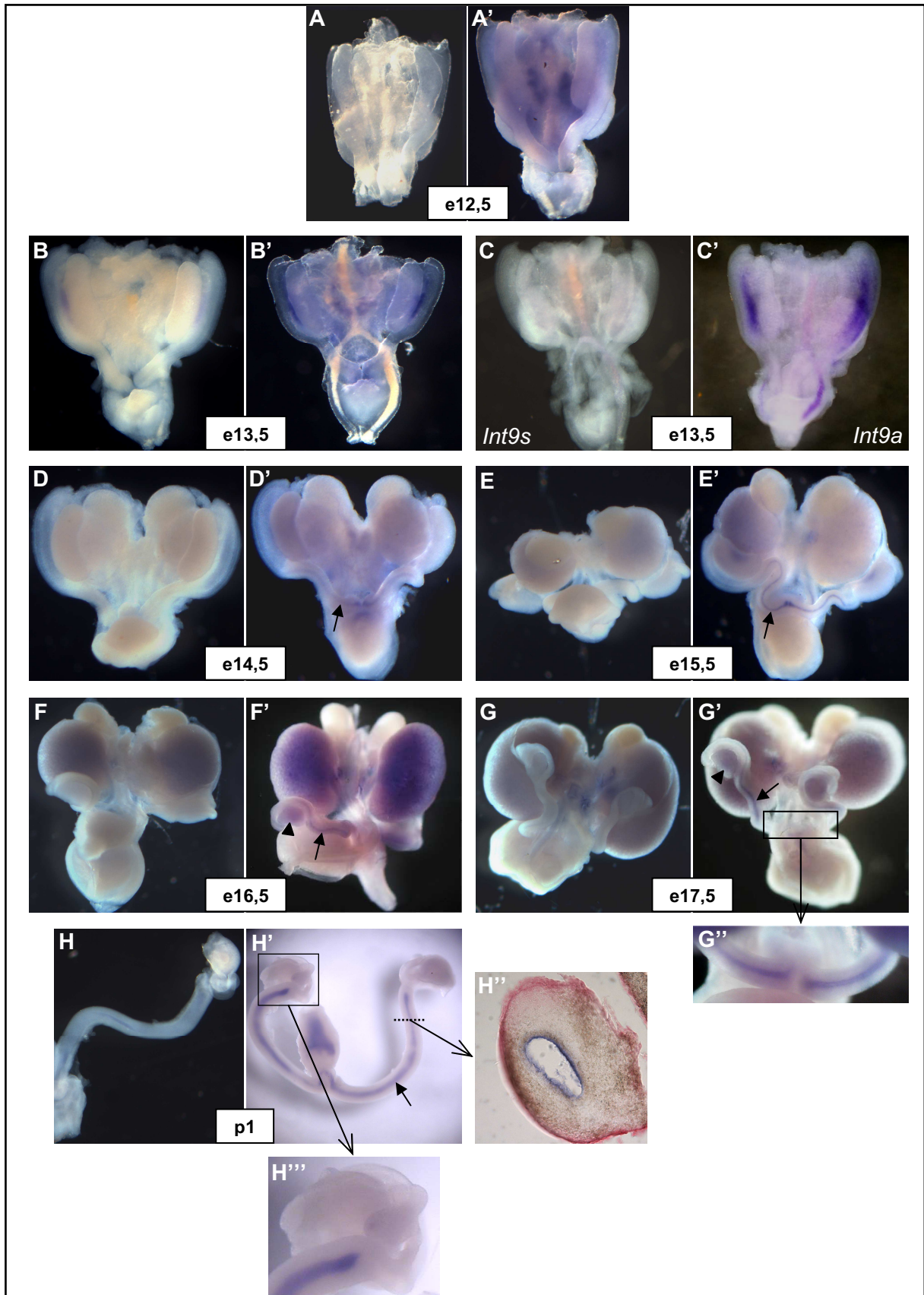
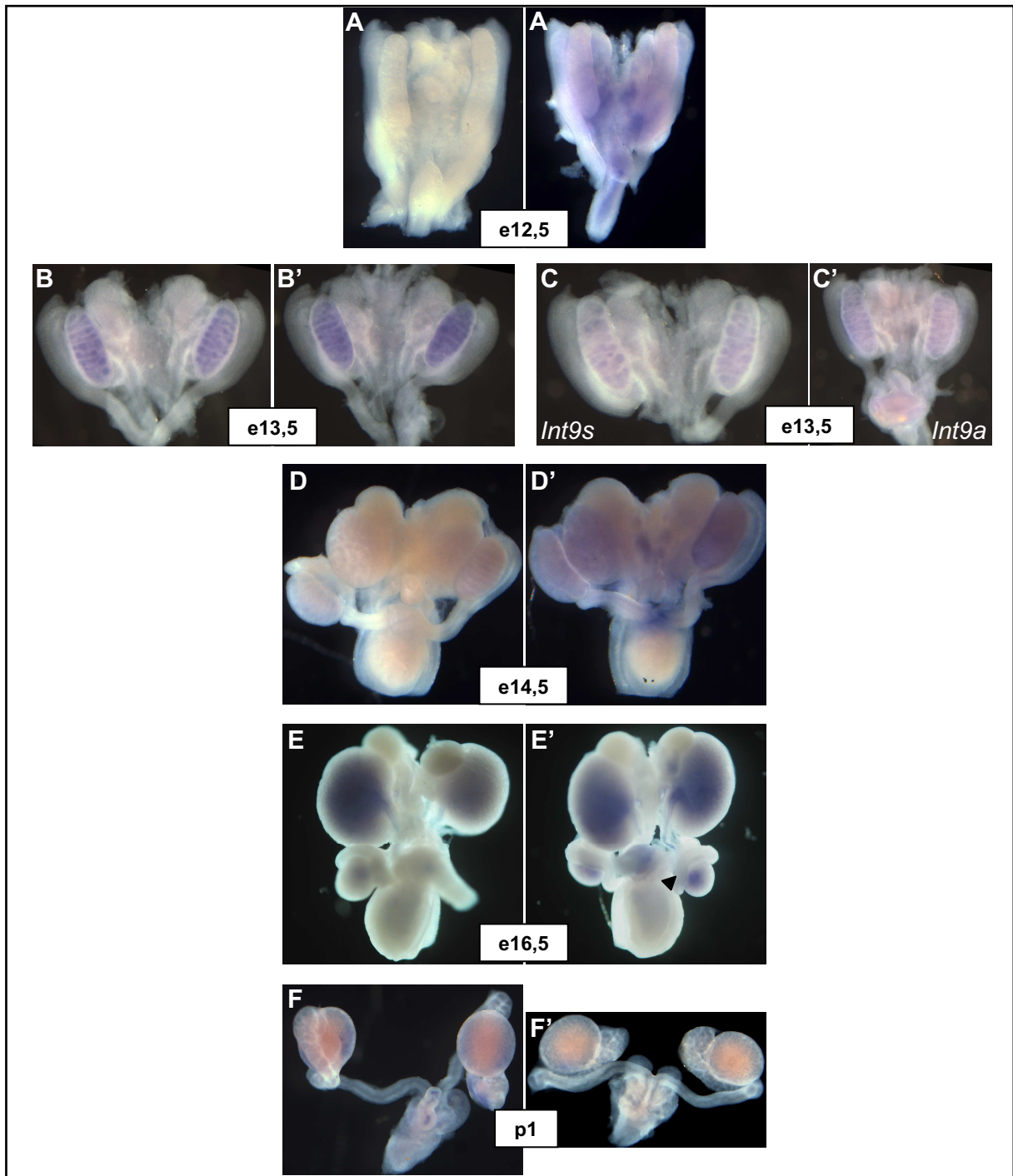


Figure 16a. Profil d'expression spatial et temporel de *mTcf712* dans le tractus urogénital femelle en développement par HIS. Légende page ci-contre.

Chez la femelle, l'exploration du profil d'expression spatio-temporel du gène *mTcf7l2* au cours du développement urogénital (**Figure 16a**) nous a permis d'observer, à l'aide de la sonde BCBD, un marquage de l'ensemble des structures mésonéphrotiques aux stades 12,5 et 13,5 *jpc*, indiquant une expression généralisée de ce gène lors de la mise en place des systèmes urinaires et génitaux. Le stade 13,5 *jpc* est également l'unique stade auquel un signal spécifique a pu être obtenu avec la sonde antisens Int9 (ciblant le milieu de l'intron 9 de *mTcf7l2*), correspondant vraisemblablement aux cellules du mésenchyme mésonéphrotique. Ce marquage, qui n'a pas pu être confirmé avec la sonde Ex9Int9, reste cependant sujet à caution. Dès 14,5 jours de gestation, les canaux paramésonéphrotiques en début de différenciation deviennent le siège de l'expression de *mTcf7l2*, celle-ci ne concernant approximativement que la moitié postérieure des canaux de Müller. Détectable aux stades embryonnaires 15,5, 16,5 et 17,5 *jpc*, cette expression très localisée intéresse visiblement les cellules lumino-épithéliales des canaux müllériens, une observation confirmée par l'analyse microscopique de coupes de tractus génital femelle marqué au stade 1 *jpp*. A ce stade postnatal, une frontière très précise d'expression du gène *mTcf7l2* sépare les oviductes des cornes utérines, suggérant un rôle spécifique des produits de ce gène dans les processus de différenciation des voies génitales internes femelles selon l'axe antéro-postérieur.

---

**Figure 16a. Profil d'expression spatial et temporel de *mTcf7l2* dans le tractus urogénital femelle en développement par HIS.** Ces expériences de HIS ont été réalisées sur des tractus urogénitaux femelles du stade 12,5 *jpc* (**e12,5**) au stade postnatal 1 *jpp* (**p1**) à l'aide des ribosondes BCBD sens (**A, B, D, E, F, G, H**) ou antisens (**A', B', D', E', F', G', H'**), et Int9 sens (**C**) ou antisens (**C'**). Toutes les photos, hormis **G''** et **H''**, correspondent à des vues ventrales. L'analyse des territoires d'expression du gène *mTcf7l2* à l'aide de la ribosonde BCBD montre un marquage de l'ensemble du tractus urogénital à 12,5 (**A'**) et 13,5 *jpc* (**B'**). Seul ce dernier stade a permis la détection d'un signal spécifique avec la sonde antisens Int9 (*Int9a*), principalement localisé dans le mésenchyme mésonéphrotique mais *a priori* exclu des gonades (**C'**). On constate que les canaux de Müller expriment *mTcf7l2* dès 14,5 *jpc* (flèche noire, **D'**) et que cette expression très régionalisée reste détectable aux stades 15,5, 16,5 et 17,5 *jpc* (flèches noires, **E', F', G'** respectivement) et perdure au moins jusqu'à la naissance (flèche noire, **H'**). L'encart **G''** est un agrandissement du tractus urogénital en vue dorsale révélant un marquage des cellules épithéliales müllériennes. Des coupes de tractus génital marqué au stade 1 *jpp* (**H'**) confirment cette expression dans les cellules de l'épithélium luminal des canaux de Müller (**H''**). A ce stade, une frontière très nette d'expression est observée entre les cornes utérines et les oviductes (**H'''**). Par ailleurs, l'expression de *mTcf7l2* au niveau gonadique ne paraît significative qu'aux stades 16,5 et 17,5 *jpc* (pointes de flèches noires, **F'** et **G'** respectivement), l'absence de marquage ovarien au stade 1 *jpp* indiquant une expression très transitoire du gène. Finalement, *mTcf7l2* semble exprimé dans le rein en cours de différenciation (**F', G'**) bien qu'un marquage aspécifique avec la ribosonde sens BCBD soit détecté (**F, G**). Les glandes surrénales et la vessie sont les seules structures du tractus urogénital n'exhibant aucun marquage, quel que soit le stade développemental considéré. e, embryonic ; p, postnatal.



**Figure 16b. Profil d'expression spatial et temporel de *mTcf712* dans le tractus urogénital mâle en développement par HIS.** Des tractus urogénitaux mâles ont été hybridés avec les sondes BCBD sens (A, B, D, E, F) ou antisens (A', B', D', E', F'), et Int sens (C) ou antisens (C'), du stade 12,5 *jpc* (e12,5) jusqu'à 1 jour après la naissance (p1). Les photos correspondent à des vues ventrales. Comme précédemment, *mTcf712* est exprimé dans l'ensemble du mésonéphros au stade 12,5 *jpc* (A'). Curieusement, les structures pré-sertoliennes au stade 13,5 *jpc* montrent un marquage important avec la ribosonde BCBD en sens (B) et antisens (B'), ce marquage étant plus léger mais également détectable avec la ribosonde Int en sens (C) et antisens (C'). Cette observation, reproductible, reste inexplicée. *mTcf712* apparaît ensuite faiblement exprimé dans les testicules aux stades 14,5 et 16,5 *jpc* (D' et E' respectivement) et est indétectable à 1 *jpp* (F'). Aucun marquage n'est constaté dans les canaux wolffiens en cours de différenciation (pointe de flèche noire, E').

Au niveau des gonades, un marquage significatif est observé aux stades 16,5 et 17,5 *jpc* mais n'est plus détectable à la naissance, indiquant que *mTcf7l2* pourrait également jouer un rôle lors de la différenciation ovarienne précoce comme le suggéraient déjà nos expériences de RT-PCRq. Concernant le système urinaire, les résultats obtenus sont plus ambigus, étant donné le bruit de fond important révélé par la ribosonde sens BCBD au niveau rénal. Néanmoins, l'expression de *mTcf7l2* semble significative à partir de 16,5 jours de gestation, des données de la littérature confirmant son expression rénale aux stades embryonnaires 16,5 et 18,5 *jpc* (Cho and Dressler, 1998; Korinek *et al.*, 1998b). A noter qu'aucun marquage des glandes surrénales et de la vessie n'a été détecté aux stades développementaux étudiés.

Cette analyse par HIS du tractus urogénital femelle en développement révèle un profil d'expression spatio-temporel dynamique de *mTcf7l2* au niveau des voies génitales internes et des gonades femelles en cours de différenciation. Cette observation suggère que les produits de ce gène jouent un double rôle dans le processus de différenciation du tractus reproducteur femelle, l'un au cours de la différenciation des canaux de Müller, l'autre lors de la différenciation ovarienne précoce.

Les mêmes expériences d'HIS conduites chez le mâle (**Figure 16b**) ont confirmé l'expression de *mTcf7l2* dans l'ensemble des structures mésonéphrotiques au stade 12,5 *jpc*, *i.e.* avant le processus de différenciation sexuelle des voies génitales internes. Au stade 13,5 *jpc*, un marquage très inattendu est observé au niveau testiculaire tant avec la sonde BCBD sens qu'avec la ribosonde antisens et, mais de manière moins évidente, les sondes Int9 sens et antisens. Malgré la possibilité d'un signal artefactuel, ce marquage vraisemblablement limité aux structures pré-sertoliennes a été obtenu de façon reproductible. De plus, aucune expérience d'HIS à l'aide des mêmes ribosondes sur des tractus urogénitaux femelles isolés au même stade n'a révélé de marquage similaire au niveau gonadique. Cette observation, qui reste toutefois à confirmer, n'a pas trouvé d'explication. Aux stades gestationnels 14,5 et 16,5 *jpc*, l'expression du gène *mTcf7l2* dans les gonades semble relativement faible mais significative, sans concerner toutefois de structures testiculaires particulières. Aucun marquage spécifique des testicules n'a pu être détecté après la naissance.

Concernant les canaux de Wolff, *i.e.* les ébauches embryonnaires des futures voies génitales internes mâles, aucune expression de *mTcf7l2* n'y a été observée, quel que soit le stade de différenciation exploré. Cette constatation d'un profil d'expression différentiel en fonction du sexe renforce notre hypothèse selon laquelle *mTcf7l2* pourrait avoir un rôle

spécifique chez les individus femelles, au cours du développement et de la différenciation des canaux müllériens.

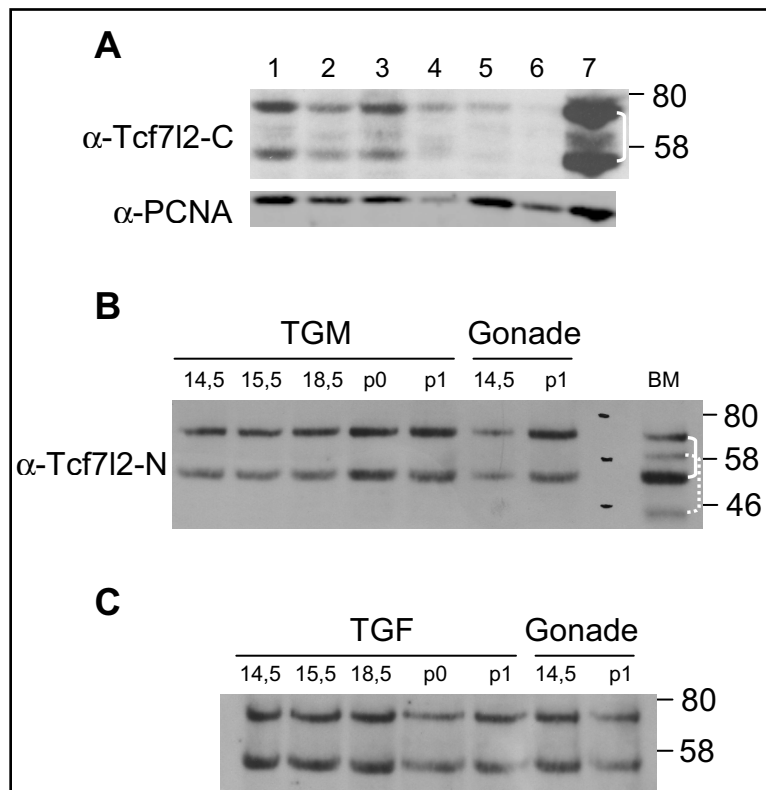
En ce qui concerne le tractus urinaire, malgré un signal aspécifique non négligeable au stade 16,5 *jpc* (**Fig. 16b-E**), les reins embryonnaires semblent bien exprimer *mTcf712*, confirmant les résultats précédents. Ces expériences d'HIS ont également permis de vérifier l'absence de tout marquage au sein des glandes surrénales et au niveau de la vessie.

Cette étude par HIS des régions d'expression de *mTcf712* au cours du développement du tractus urogénital mâle, à l'aide des trois sondes précédemment détaillées à chaque stade étudié, n'a pas permis d'observer de signal spécifique avec les sondes Int9 et Ex9Int9 (conçues pour cibler les ARNm encodant les formes tronquées de *mTcf712*) au cours du processus de régression des canaux de Müller. Excepté un problème technique lié à la conception des ribosondes, il est possible que la sensibilité de la technique d'HIS sur organes isolés mise en œuvre ne soit pas suffisante pour détecter des ARNm très peu exprimés ou dont l'expression est cantonnée à une population restreinte de cellules. Des expériences complémentaires d'HIS sur coupes histologiques d'embryon mâle n'ont pas davantage permis la détection d'un marquage spécifique au niveau des canaux müllériens en régression (données non présentées).

Cette absence de marquage spécifique constatée au cours de ces expérimentations par HIS avec les ribosondes Ex9Int9 ou Int9 est une observation difficilement réconciliable avec les résultats initiaux de DDRT-PCR révélant l'induction par l'AMH de l'expression d'ARNm alternatifs de *mTcf712* encodant des isoformes protéiques dépourvues de domaine HMG. En effet, aucun des profils d'expression de *mTcf712* observés au cours du développement urogénital mâle ou femelle n'a permis de rendre compte d'une surexpression de ces ARNm alternatifs ni au niveau gonadique ni au niveau des voies génitales internes, dans la fenêtre temporelle adéquate (*i.e.* entre 13,5 et 15,5 *jpc*). Le clonage et le séquençage des ARNm *mTcf712*-G et -H à partir d'ARN totaux extraits de tractus génitaux mâle et femelle aux stades 13,5 et 15,5 *jpc* (*Cf. chapitre II-B-3-1*) indiquent qu'ils sont pourtant bel et bien exprimés. Il est donc possible que leur niveau d'expression soit réellement trop bas pour que leur localisation au sein de tissus embryonnaires soit appréciable par cette technique d'hybridation *in situ*.

De manière indirecte, cette absence de signal spécifique observée pour les sondes Ex9Int9 et Int9, associée aux résultats obtenus avec la sonde BCBD (notamment au niveau des canaux müllériens en différenciation), laisse supposer que les ARNm détectés par cette dernière ribosonde sont ceux encodant la forme pleine longueur de *mTcf712*.





**Figure 17. Immunodétection des isoformes protéiques de mTcf712 sur protéines totales extraites de tractus urogénitaux mâle et femelle en développement. A)** Les anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale de mTcf712 ( $\alpha$ -Tcf712-C) permettent la détection d'un doublet dans la majorité des tissus testés : reins aux stades 14,5 et 18,5 *jpc* (pistes 1 et 2 respectivement), intestin à 18,5 *jpc* (piste 3), placenta (piste 4), foie aux stades 13,5 et 18,5 *jpc* (pistes 5 et 6 respectivement). L'analyse des bourgeons de membres au stade 11,5 *jpc* (piste 7) révèle deux bandes très majoritaires correspondant au doublet identifié dans les autres pistes. L'anticorps  $\alpha$ -PCNA est utilisé en tant que contrôle de charge. Des résultats identiques ont été obtenus avec l'anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale de mTcf712 ( $\alpha$ -Tcf712-N). Les poids moléculaires sont exprimés en kDa. **B)** La même expérience conduite sur des extraits protéiques de tractus reproducteur à l'aide de l'anticorps  $\alpha$ -Tcf712-N montre que l'isoforme majoritaire des bourgeons de membres (BM) est également détectée au niveau du tractus génital interne mâle (TGM) ainsi que dans les gonades à tous les stades étudiés, sans dynamique d'expression particulière observable (le faible signal de la piste « Gonade-14,5 » est dû à un problème de dépôt). Deux bandes minoritaires sont visibles dans la piste « BM » (crochet blanc en pointillés) et absentes de toutes les autres. Aucune protéine mTcf712 tronquée au poids moléculaire attendu (environ 30 kDa) n'a pu être détectée à aucun des stades explorés. **C)** La même expérience conduite au cours du développement du tractus génital interne et des gonades chez la femelle montre que *mTcf712* est également exprimé, sans variation notable en terme quantitatif. L'isoforme détectée est identique à celle retrouvée chez le mâle.

### 3-3) Immunodétection des isoformes de mTcf712

Cette étude par détection immunologique des isoformes de mTcf712 a été réalisée sur des extraits de protéines totales issus de différents tissus embryonnaires, dont les tractus génitaux mâle et femelle, à l'aide d'anticorps dirigés contre l'extrémité N-terminale ou C-terminale. Des extraits protéiques de bourgeons de membres au stade 11,5 *jpc* et d'intestin au stade 18,5 *jpc* servent ici de contrôles positifs puisque l'expression de *mTcf712* y a été rapportée dans la littérature et validée par nos études d'expression au niveau des ARNm. Cette analyse par western blot démontre bien l'expression des formes pleine longueur de mTcf712 dans ces organes embryonnaires, permettant la validation de la spécificité des anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale de mTcf712 (**Figure 17**). Selon les données du fournisseur, les deux bandes très majoritaires détectées dans les extraits protéiques de bourgeons de membres (**Fig. 17-A**) correspondraient à une seule et même isoforme de mTcf712, la différence dans les distances de migration s'expliquant par une modification post-traductionnelle non déterminée à ce jour. Des expériences de surexpression des isoformes tronquées mTcf712-G et -H en système cellulaire nous ont d'ailleurs permis d'observer qu'elles étaient chacune détectées sous forme de doublets par l'anticorps dirigé contre la partie N-terminale (données non présentées). De la même façon, quatre bandes électrophorétiques sont détectées avec ce même anticorps dans les bourgeons de membres (**Fig. 17-B**), correspondant vraisemblablement à deux isoformes longues de mTcf712 susceptibles de subir des modifications post-traductionnelles. L'isoforme pleine longueur majoritairement exprimée dans les bourgeons de membres est retrouvée, à un niveau moindre, dans les reins embryonnaires comme nos expériences précédentes le suggéraient, et est à peine détectable dans le foie en développement (**Fig. 17-A**). Malgré un contrôle de charge assez variable, le placenta semble également être un lieu d'expression du gène *mTcf712*.

Au cours du développement du tractus reproducteur mâle, mTcf712 est également détecté sous la forme d'un doublet, identique à celui révélé dans les tissus précédemment étudiés (**Fig. 17-B**). Curieusement, son expression au niveau protéique apparaît relativement stable au cours de la différenciation des voies génitales internes ainsi que de la différenciation gonadique (un problème technique de dépôt explique le faible signal de la piste « Gonade-14,5 » du panel B). Des résultats très similaires sont obtenus chez la femelle, la quantité de protéines mTcf712 variant peu entre les différents stades développementaux étudiés (**Fig. 17-C**). Finalement, aucune bande spécifique n'a été observée aux alentours de 30 kDa, poids moléculaire théorique des isoformes protéiques tronquées de mTcf712, quel que soit le tissu

considéré. A l’image des expériences précédentes d’HIS, il est possible que la sensibilité de cette technique de détection immunologique ne soit pas suffisante pour mettre en évidence ces isoformes dépourvues de boîte HMG. Ces protéines, dont l’existence n’a été prouvée que par amplification par PCR de leur ADNc correspondant dans l’ensemble de cette étude, sont donc probablement très peu exprimées au niveau des différents tissus embryonnaires étudiés. Il est cependant tout à fait concevable que l’expression de ces isoformes tronquées soit limitée à un petit nombre de cellules engagées dans un processus cellulaire particulier. Des expériences complémentaires d’immunodétection sur des coupes histologiques de tractus génitaux mâles et femelles pourraient permettre d’identifier les types cellulaires exprimant ces protéines tronquées.

#### 4) Approche fonctionnelle *in vivo* des isoformes tronquées par transgénèse transitoire chez la souris

Etant donné les résultats initiaux de DDRT-PCR montrant la surexpression d'une forme tronquée de mTcf712 induite sous l'action de l'AMH, cette première approche a consisté à cibler les cellules exprimant le récepteur de cette hormone, par le biais du promoteur du gène *AMHR2*. Nous avons généré deux constructions hybrides d'ADN comportant l'ADNc codant pour la forme G (pAMHR2-ORF-G) ou H (pAMHR2-ORF-H) de mTcf712 sous la dépendance du promoteur *AMHR2* (Teixeira *et al.*, 1999; Arango *et al.*, 2008). Ces constructions ont été injectées dans des œufs fécondés selon les protocoles classiques de transgénèse.

L’analyse phénotypique du tractus génital a ensuite été réalisée sur l’ensemble des animaux (embryons entre 16,5 et 18,5 *jpc*, ou nouveaux-nés). Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant.

**Tableau 5. Bilan de l’analyse phénotypique des embryons surexprimant les isoformes G et H de mTcf712 sous contrôle du promoteur AMHR2.**

Transgène microinjecté	Nombre total d’animaux étudiés	Pourcentage d’animaux transgéniques	Phénotype
pAMHR2-ORF-G	134	23,5 %	Aucun
pAMHR2-ORF-H	171	16,6 %	Aucun

La surexpression des formes tronquées G et H par l’intermédiaire du promoteur du gène *AMHR2* n’a pas permis d’observer de phénotype génital chez les animaux transgéniques mâles ou femelles. Il est possible que ce promoteur n’induisse pas de surexpression

suffisamment forte pour provoquer, comme nous l'attendions, de phénotype observable au niveau du tractus génital interne ou des gonades aux stades étudiés. Une stratégie identique de surexpression de l'AgT du virus SV40 sous contrôle du promoteur AMHR2 a d'ailleurs montré que les phénotypes induits (carcinomes ovariens essentiellement, léiomyomes utérins parfois) ne sont observables qu'à partir de la 6<sup>ème</sup> semaine après la naissance (Connolly *et al.*, 2003). Nous avons ainsi conservé deux portées de souris transgéniques afin de les étudier à un stade post-natal plus tardif que ceux explorés précédemment. Leur phénotype n'a pas encore été examiné à ce jour.

### C) Discussion - perspectives

Cette étude descriptive du profil d'expression spatio-temporel de *mTcf712* lors du développement du tractus reproducteur interne a pour point de départ la caractérisation, en système de culture organotypique de mésonephros femelle au stade sexuellement indifférencié, d'un ARNm alternatif de ce gène surexprimé sous l'action de l'AMH. Le séquençage de l'ADNc sous-cloné correspondant a montré qu'il pouvait se rapporter à l'une des trois formes possibles d'ARNm de *mTcf712* dont les séquences en nucléotides prédisent la synthèse d'isoformes protéiques tronquées du domaine HMG de liaison à l'ADN. Ces ARNm alternatifs, qui ne sont pas *a priori* des substrats du système de dégradation NMD, semblent coder pour ces isoformes courtes de *mTcf712* via un mécanisme co- ou post-transcriptionnel de rétention d'intron conduisant à l'apparition d'un codon de terminaison de la traduction immédiatement en aval de l'exon 9. L'analyse des séquences introniques encadrant cet exon révèle l'existence d'éléments non codants évolutivement très conservés chez les Vertébrés, suggérant qu'ils constituent des régions régulatrices fonctionnelles. Une étude approfondie de ces éléments hautement conservés entre les génomes de plusieurs vertébrés a d'ailleurs montré qu'ils étaient significativement associés à la 3'UTR d'ARNm encodant des protéines de liaison à l'ADN ou à l'ARN, et qu'ils étaient par ailleurs particulièrement enclins à former des structures secondaires (Siepel *et al.*, 2005). Bien que leur rôle ne soit pas clairement établi, l'existence d'une relation fonctionnelle entre la présence de tels éléments et la régulation de l'épissage alternatif a été envisagée (Sugnet *et al.*, 2006). Il est ainsi possible que les régions introniques conservées identifiées en amont et en aval de l'exon 9 de *mTcf712* aient une fonction *cis*-régulatrice dans le mécanisme d'épissage alternatif permettant de générer ces isoformes protéiques tronquées.

D'un point de vue fonctionnel, ces isoformes protéiques, dépourvues de boîte HMG et de NLS mais conservant le domaine de liaison à la  $\beta$ -caténine, sont capables d'inhiber *in vitro* le rôle de co-activateur transcriptionnel des formes pleine longueur vis-à-vis des gènes comportant dans leur promoteur des sites de fixation aux facteurs Tcf/Lef (Douglas *et al.*, 2001). Outre cet effet dominant négatif, ces formes tronquées semblent également impliquées dans la co-activation transcriptionnelle de certains gènes dont les promoteurs ne contiennent pas d'élément de réponse aux facteurs Tcf/Lef (Kennell *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que leur surexpression en cellules de cancer colorectal induit l'arrêt du cycle en phase G1 puis la différenciation de ces cellules (van de Wetering *et al.*, 2002). Au-delà de ces effets uniquement nucléaires, il est envisageable que ces isoformes courtes dénuées de NLS modifient l'équilibre entre les pools de  $\beta$ -caténine nucléaire et cytoplasmique mais aussi celui lié à la membrane plasmique en dépit de sa relative stabilité. En effet, les domaines d'interaction de mTcf712 et de l'E-cadhérine au sein de la  $\beta$ -caténine étant chevauchants et mutuellement exclusifs (Omer *et al.*, 1999), il est envisageable que les formes tronquées de mTcf712 puissent induire la délocalisation de la  $\beta$ -caténine des jonctions adhérentes et modifier ainsi les contacts entre cellules. L'identification de leur ARNm correspondant dans la glande hypophysaire en développement (Douglas *et al.*, 2001) et en culture organotypique de mésonéphros femelle soumis à l'AMH suggère que les diverses fonctions possibles de ces isoformes alternatives sont importantes *in vivo* au cours de processus de différenciation.

L'exposition à l'AMH d'un tractus reproducteur femelle sexuellement indifférencié est une situation particulière, fréquemment rencontrée chez les bovins en cas de grossesses gémellaires hétérosexuées. Portant le nom de freemartinisme, cette pathologie est liée à la présence, pendant la période de sensibilité à l'AMH, de structures anatomiques appelées anastomoses vasculaires et par lesquelles la circulation systémique des deux fœtus (de sexe différent) communique. L'AMH produite par le fœtus mâle peut ainsi atteindre le fœtus femelle *via* ces anastomoses, provoquant la régression des canaux de Müller, un processus pathologique accompagné d'une atrophie ovarienne voire d'une masculinisation gonadique (Vigier *et al.*, 1984; Vigier *et al.*, 1987). La surexpression d'un ARNm alternatif de *mTcf712* induite par l'action de l'AMH sur des mésonéphros femelles au stade sexuellement indifférencié pourrait donc être liée au mécanisme de régression des canaux müllériens et/ou à un effet sur la gonade femelle encore indifférenciée, tous deux territoires d'expression du récepteur AMHR2.

Afin de tester cette hypothèse, l'étude du profil d'expression spatio-temporel des différentes classes d'ARNm du gène *mTcf7l2* a été entreprise au cours de la mise en place et de la différenciation des voies génitales internes et des gonades mâle et femelle chez la souris.

S'appuyant sur les techniques de RT-PCR classique ou quantitative, nos premières expériences ont révélé l'absence de dimorphisme sexuel dans le niveau d'expression de *mTcf7l2* au cours du développement du tractus reproducteur, excepté au niveau gonadique où le taux de transcription paraît augmenter au cours de la différenciation ovarienne précoce. Cette observation peut être mise en relation avec les données de la littérature indiquant que la  $\beta$ -caténine, aux stades très précoces de la différenciation, constitue un déterminant de la fonction ovarienne et/ou un suppresseur de la voie de différenciation testiculaire. En effet, il a été montré que sa stabilisation artificielle dans les gonades mâles dès le stade 11,5 *jpc* contrecarre l'effet stimulateur du facteur Sry sur l'expression de *Sox9* et induit une inversion sexuelle gonadique vers un phénotype femelle (Chang *et al.*, 2008; Maatouk *et al.*, 2008). Le modèle proposé est celui d'un antagonisme moléculaire entre la  $\beta$ -caténine et *Sox9*, l'équilibre de cette balance en faveur de l'un ou l'autre de ces régulateurs transcriptionnels orientant le sens de différenciation gonadique vers un phénotype mâle ou femelle. Il est ainsi concevable que l'augmentation du taux d'expression des différentes classes d'ARNm de *mTcf7l2* observée dans l'ovaire en différenciation soit le reflet de l'importance de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans ce processus.

Malgré l'absence d'expression sexuellement dimorphique au niveau quantitatif, nous avons pu observer par hybridation *in situ* que *mTcf7l2* est exprimé dans les cellules lumino-épithéliales des canaux de Müller en différenciation uniquement chez la femelle. Cette expression très localisée au sein des voies génitales internes femelles s'étend, au stade 1 *jpp*, de la partie la plus antérieure des cornes utérines jusqu'à la partie la plus postérieure du vagin mais est exclue des oviductes. Ce profil d'expression spatial, régionalisé selon l'axe antéro-postérieur, suggère fortement que les produits du gène *mTcf7l2* exercent une fonction très spécifique au cours de la différenciation de l'épithélium müllérien, probablement par l'activation ou la répression transcriptionnelle de gènes cibles de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Dans cette hypothèse, l'absence d'expression de *mTcf7l2* dans les oviductes pourrait alors refléter un processus de différenciation épithéliale distinct de celui engagé au niveau utérin et cervico-vaginal. A noter que cette frontière précise d'expression délimite une structure tubulaire enroulée (les oviductes) d'une structure tubulaire rectiligne (utérus, col, vagin). Alors que l'expression de *Wnt7a* par les cellules épithéliales müllériennes est essentielle à cet

enroulement de la région oviductale (Parr and McMahon, 1998), de même que l'expression de la  $\beta$ -caténine par les cellules du mésenchyme péri-müllérien (Deutscher and Hung-Chang Yao, 2007), la répression transcriptionnelle du gène *mTcf712* pourrait être requise pour le développement correct des oviductes. Cette caractérisation de l'expression de *mTcf712* au cours de la différenciation des canaux de Müller et des gonades suggère ainsi que ce gène exerce un double rôle chez la femelle lors du développement sexuellement dimorphique du tractus reproducteur. Toutefois, aucun phénotype génital flagrant n'a été rapporté dans la littérature par l'analyse de souris *mTcf712*<sup>-/-</sup> (Korinek *et al.*, 1998a; Brinkmeier *et al.*, 2007), ce qui indique une certaine redondance fonctionnelle entre membres de la famille Tcf/Lef. Ces souris, dont nous disposons maintenant au laboratoire, seront très prochainement analysées d'abord d'un point de vue morphologique, puis histologique afin de détecter un éventuel phénotype au niveau cellulaire. A moyen terme, il sera également intéressant de comparer leur transcriptome au niveau génital avec celui de souris sauvages afin d'identifier des gènes candidats spécifiquement régulés par *mTcf712*.

Chez le mâle, l'AMH induisant l'accumulation cytoplasmique de  $\beta$ -caténine dans les cellules du mésenchyme péri-müllérien (Allard *et al.*, 2000), nous avons formulé l'hypothèse que les isoformes tronquées de *mTcf712* identifiées initialement en culture organotypique puissent médier cette accumulation de  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme, en excluant donc *a priori* un effet gonadique. Par la suite, la description du profil d'expression spatio-temporel de *mTcf712* au cours du développement du tractus génital interne mâle a montré qu'il n'existe pas de différences avec la femelle dans les niveaux d'expression des ARNm encodant ces formes tronquées, ni des ARNm encodant les formes pleine longueur de *mTcf712*. Nos expériences d'HIS n'ont pas non plus révélé d'expression spécifique de *mTcf712* au cours du processus de régression des canaux de Müller. Ces observations, qui semblent difficilement conciliables avec notre hypothèse initiale, peuvent cependant trouver plusieurs explications non exclusives. L'une d'entre elles, évoquée précédemment, voudrait qu'il existe un mécanisme moléculaire commun à la régression des canaux de Müller chez le mâle et des canaux de Wolff chez la femelle, expliquant qu'aucune expression sexuellement dimorphique n'ait été observée en terme quantitatif. Cette hypothèse est toutefois assez discutable, aucun processus actif n'ayant été décrit concernant la « régression » des canaux de Wolff, hormis dans leur partie caudale où le facteur *Msx2* joue un rôle pro-apoptotique (Yin *et al.*, 2006). Une seconde explication pourrait être liée au système organotypique en soi. Il est en effet possible

que la régression müllérienne *in vitro* par exposition à l'AMH se fasse plus rapidement que dans la situation *in vivo* et de manière uniforme tout au long des canaux de Müller. Dans cette hypothèse, la caractérisation d'un ARNm alternatif de *mTcf712* fortement induit par l'AMH en culture organotypique mais l'absence de détection de cette surexpression *in vivo* au cours de la régression müllérienne pourrait provenir de cette différence dans la « cinétique » du processus de régression. La sensibilité limitée de la technique d'HIS sur organes isolés, associée aux niveaux manifestement très faibles d'expression des ARNm codant pour les formes tronquées de *mTcf712* dans les tissus étudiés, expliquerait ainsi qu'aucune surexpression de ces ARNm n'ait pu être observée au cours de la régression müllérienne. Enfin, une troisième explication consisterait à imputer l'expression différentielle de cet ARNm alternatif aux mécanismes moléculaires de masculinisation de la gonade femelle sous l'effet de l'AMH : atrophie ovarienne, déplétion des cellules germinales, développement de structures ressemblant aux tubules séminifères et dans lesquelles des cellules pseudo-sertoliennes sont retrouvées. Ces processus, qui caractérisent l'ovaire freemartin, n'étaient donc pas abordables par notre étude *in vivo* au cours du développement normal des tractus reproducteurs mâle et femelle.

Dans nos expériences d'HIS, la détection à l'aide de la sonde Int9 d'un marquage du mésenchyme mésonéphrotique chez la femelle et des structures pré-sertoliennes chez le mâle au stade 13,5 *jpc* n'a pas pu être confirmée par la sonde Ex9Int9. Ces observations, qui restent donc conditionnelles, ne permettent cependant pas de réconcilier les résultats initiaux de DDRT-PCR avec nos études du profil d'expression des ARNm de *mTcf712*, au vu de leur fenêtre temporelle respective (13,5 *jpc* en HIS, 13,5 *jpc* + 1,5 jour de culture en DDRT-PCR). De la même façon, le signal important révélé à l'aide des ribosondes BCBD sens et antisens au niveau de ces structures pré-sertoliennes chez le mâle n'a pas non plus trouvé d'explication. La reproductibilité de ce marquage gonadique, et son absence constatée au sein des ovaires au même stade, semble toutefois exclure tout artefact technique. Afin de confirmer ou d'infirmer ces marquages inexplicables, d'autres expériences d'HIS semblent nécessaires, à l'aide de nouvelles ribosondes ciblant des régions proches mais distinctes de celles ciblées par les précédentes.

Finalement, notre étude au niveau protéique a montré que les isoformes pleine longueur de *mTcf712* sont exprimées de façon relativement constante au cours du développement du tractus reproducteur mâle et femelle, leur profil d'expression ne présentant aucune modification importante de leur niveau d'expression entre stades étudiés. De plus, nos essais d'immunodétection à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de *mTcf712*



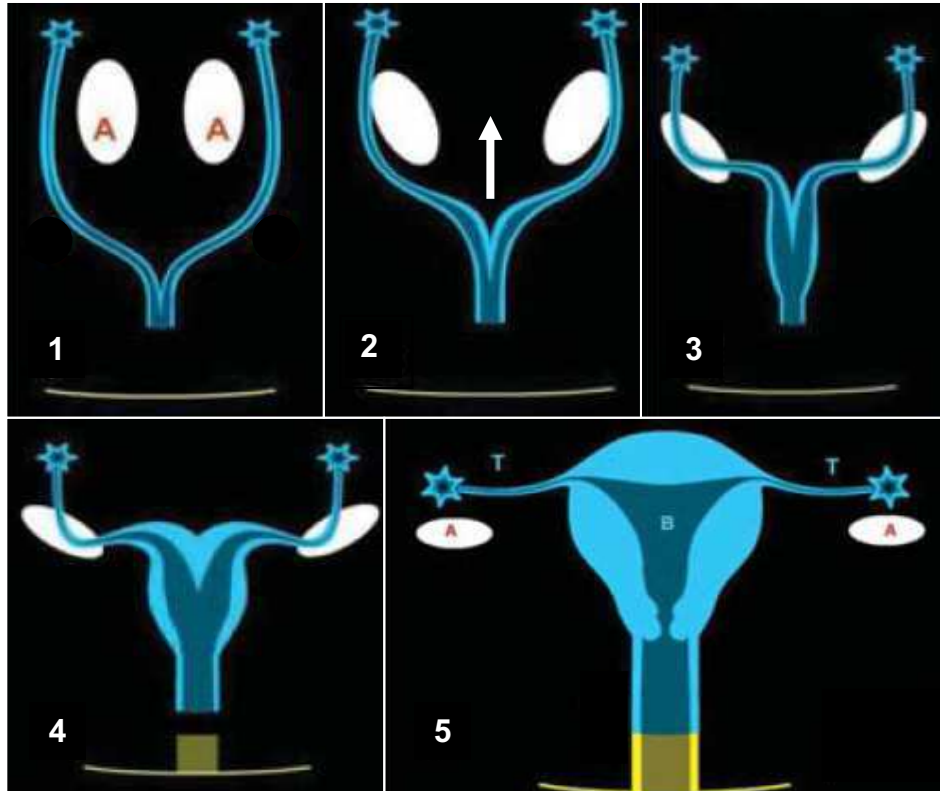
n'ont pas permis de révéler *in vivo* la présence des protéines tronquées, renforçant l'hypothèse selon laquelle ces protéines sont exprimées très faiblement. D'un point de vue fonctionnel, l'absence de phénotype lié à la surexpression des isoformes courtes G ou H dans les cellules exprimant le récepteur AMHR2 indique que ces protéines tronquées ne constituent pas des composants de la signalisation par l'AMH suffisants pour médier son action. Il est cependant possible qu'elles puissent participer, au niveau nucléaire ou non, aux processus de migration ou de transition épithélio-mésenchymateuse des cellules de l'épithélium cœlomique induits sous l'action de l'AMH (Zhan *et al.*, 2006).

L'ensemble des observations effectuées dans cette étude du rôle de *mTcf7l2* dans le développement urogénital sont difficilement réconciliables au sein d'un modèle unique. La nature très hétérogène des tissus étudiés en termes de types cellulaires est probablement une raison majeure expliquant ces apparentes discordances. Ainsi, plutôt qu'une analyse globale de ces tissus moyennant les niveaux d'expression des différentes isoformes de *mTcf7l2*, il apparaît maintenant indispensable d'atteindre une résolution suffisamment grande pour étudier spécifiquement la présence des diverses isoformes de ce gène dans chacun des types cellulaires présents dans ces tissus en constante évolution. Les travaux d'une équipe cherchant à caractériser les différents ARNm alternatifs de *mTcf7l2* au cours du développement du cervelet chez la souris ont abouti à la même conclusion (Nazwar *et al.*, 2009).

Les approches d'immunohistologie et d'hybridation *in situ* sur coupes constituent des techniques de choix pour ces études descriptives. En fonction des résultats obtenus, il sera alors possible d'envisager des expériences fonctionnelles *in vivo* de surexpression ou d'inactivation conditionnelle de tout ou partie des différentes isoformes de *mTcf7l2* sous contrôle de promoteurs spécifiques (s'ils existent) ciblant les types cellulaires d'intérêt. Dans ce cadre, bien qu'aucun phénotype n'ait pu être décelé aux stades périnataux déjà explorés, nos expériences de transgénèse transitoire préfiguraient cette stratégie, essentielle pour attribuer aux différents produits du gène *mTcf7l2* une fonction biologique spécifique au cours de ces processus développementaux.

# Partie 2

*Etude d'une pathologie malformative congénitale  
affectant le tractus génital féminin :  
le syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser*



**Figure 18. Développement et différenciation des voies génitales internes chez la femme.** Initialement formés par invagination de l'épithélium cœlomique de la région antérieure du mésonéphros (1), les canaux de Müller (en bleu) fusionnent latéralement dans leur partie inférieure (2) pour former le canal utéro-vaginal. Les parties antérieures non fusionnées donneront naissance aux trompes de Fallope (T) et à leur pavillon. Ce processus de fusion s'effectue dans le sens postéro-antérieur et s'achève vers la fin de la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation. La paroi inter-müllérienne qui résulte de cette fusion latérale se résorbe progressivement entre la 14<sup>ème</sup> et la 18<sup>ème</sup> semaine (3 et 4), permettant la formation d'un utérus unique non cloisonné (5). Le vagin est issu de la fusion verticale du sinus urogénital (en jaune), d'origine endodermique, avec la partie la plus postérieure des canaux de Müller (5). Seuls les 2/3 supérieurs du vagin sont ainsi dérivés du mésoderme. A, ovaire ; T, trompe de Fallope ; B, utérus. D'après (Ferreira *et al.*, 2007).

## Partie 2

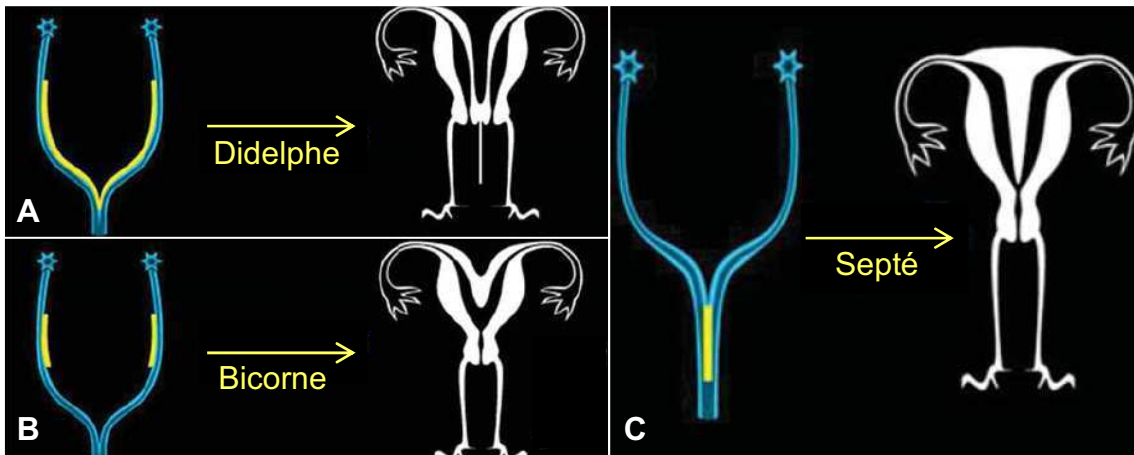
### Etude d'une pathologie malformative congénitale affectant le tractus génital féminin : le syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH)

#### I. Développement du tractus génital interne féminin et anomalies müllériennes

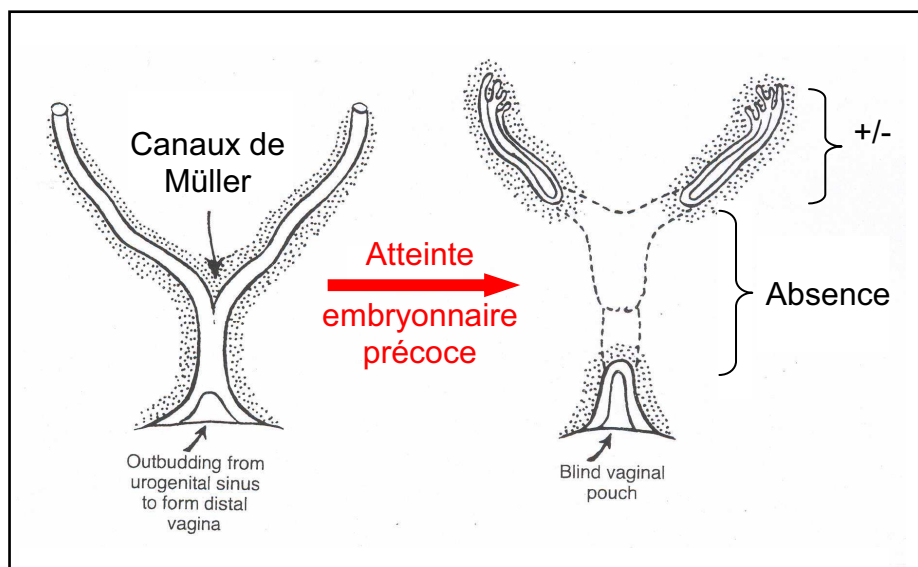
Chez la femme, la différenciation normale des canaux de Müller en trompes, utérus, col de l'utérus et partie supérieure du vagin est un processus accompli en trois grandes phases successives (**Figure 18**) :

- une première phase organogénétique au cours de laquelle les canaux müllériens se mettent en place suivant une séquence elle-même divisible en trois étapes : spécification de cellules à la surface de l'épithélium cœlomique, invagination de celles-ci dans le sens crânio-caudal puis élongation des canaux de Müller jusqu'à la partie postérieure du sinus urogénital auquel ils fusionneront pour donner le 1/3 inférieur du vagin (fusion verticale),
- une phase de fusion latérale mutuelle des canaux de Müller aboutissant *in fine* à la formation de l'utérus, du col et des 2/3 supérieurs du vagin, les extrémités les plus antérieures non fusionnées donnant naissance aux trompes utérines et à leur(s) pavillon(s),
- une phase de résorption de la cloison médiane (ou inter-müllérienne), structure consécutive à la fusion préalable des canaux de Müller.

Les anomalies müllériennes correspondent à un ensemble de malformations utéro-vaginales congénitales résultant d'un défaut de développement, de fusion ou de résorption des dérivés müllériens. La classification la plus courante, proposée par l'*American Fertility Society* (AFS) (1988), les range en 7 catégories distinctes, le type de malformations observées dépendant essentiellement du stade morphogénétique perturbé ou interrompu (**Figure 19**). Ainsi, le développement incomplet de l'un ou des deux conduits paramésonephrotiques lors de la phase d'organogenèse peut conduire à une agénésie ou une hypoplasie utéro-vaginale plus ou moins sévère (classe I) ou à la formation d'un utérus unicorne (classe II). A un stade plus tardif, des défauts de fusion latérale conduiront à un utérus didelphe (classe III) si les deux canaux de Müller restent totalement indépendants, ou à un utérus bicorne (classe IV) si le processus de fusion est partiel. Les classes V (utérus cloisonné) et VI (utérus à fond arqué) ont pour origine un défaut de résorption de la cloison d'accolement des canaux müllériens, la classe VI étant souvent considérée comme un variant anatomique naturel. Enfin, la classe VII



**Figure 19. Anomalies développementales des dérivés müllériens et impact sur la morphologie du tractus génital féminin.** Selon l'âge gestationnel de survenue de l'atteinte embryonnaire, donc selon le stade développemental interrompu, on différencie plusieurs types de malformations utérines. L'absence totale de fusion latérale des canaux de Müller aboutit à la formation d'un utérus didelphe compatible avec la gestation, chaque corne étant un utérus entièrement développé (A). L'utérus bicorne résulte quant à lui d'une fusion latérale partielle des canaux müllériens (B) et est associé le plus souvent à un col de l'utérus unique. Des troubles de résorption de la cloison inter-müllérienne conduisent à un utérus septé (ou cloisonné) total (C) ou partiel selon l'ampleur du défaut de résorption. D'après (Ferreira *et al.*, 2007).



**Figure 20. Séquence de Rokitansky.** Le syndrome MRKH se caractérise par l'absence d'utérus et des 2/3 supérieurs du vagin associée à une aplasie plus ou moins importante des trompes, chez des femmes aux caractères sexuels secondaires normaux dus à la présence d'ovaires normaux et fonctionnels. L'aplasie utéro-vaginale est vraisemblablement liée à un arrêt précoce de la différenciation des canaux de Müller dont la cause est inconnue. D'après (Jones, 1988).

regroupe les malformations utéro-vaginales (utérus en forme de T) liées à l'exposition *in utero* au diéthylstilbestrol, un analogue œstrogénique au fort pouvoir tératogène (Kaufman *et al.*, 1977; Newbold, 2008).

Les anomalies müllériennes ont une incidence moyenne estimée à 4 % dans la population générale ainsi que chez les femmes fertiles, alors qu'elle est proche de 12 % chez les femmes sujettes à des avortements spontanés (Grimbizis *et al.*, 2001), les malformations les plus fréquemment rencontrées étant les utérus cloisonnés (35 %) et bicornes (25 %). Le développement embryonnaire du tractus génital interne étant intimement lié au développement du système urinaire, les anomalies müllériennes sont retrouvées associées à des malformations rénales dans 30 % des cas, notamment des agénésies rénales et, dans une moindre mesure, des hypoplasies rénales ou des reins en fer à cheval (Li *et al.*, 2000). Les malformations osseuses sont en fréquence la deuxième malformation associée aux anomalies utérines.

L'étiologie des anomalies müllériennes est encore inconnue pour la plupart d'entre elles. D'un point de vue embryologique, l'association non aléatoire de malformations génitales, urinaires et squelettiques suggère toutefois une atteinte embryonnaire précoce du mésoderme intermédiaire.

## II. Le syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH)

### A) Définition du syndrome MRKH et données cliniques

Décrit pour la première fois en tant que syndrome par Mayer (Mayer, 1829) puis étudié successivement par Rokitansky (Rokitansky, 1838), Küster (Küster, 1910) et Hauser (Hauser and Schreiner, 1961), le syndrome éponyme MRKH (OMIM 277000) appartient à la classe I définie par l'AFS et correspond à une pathologie malformative congénitale du tractus génital féminin dont la caractéristique clinique première est l'absence d'utérus et des 2/3 supérieurs du vagin (**Figure 20**). D'une incidence estimée à 1/4500 naissances (Griffin *et al.*, 1976; Folch *et al.*, 2000), l'aplasie utéro-vaginale est le plus souvent diagnostiquée à l'adolescence chez des patientes atteintes d'aménorrhée primaire, signal d'appel principal de cette pathologie. Ces femmes montrent cependant un développement sexuel secondaire normal, imputable à la présence d'ovaires normaux et fonctionnels (Fraser *et al.*, 1973), permettant un diagnostic clinique différentiel (Morcel *et al.*, 2007). Outre l'aplasie utéro-vaginale isolée (ou MRKH de type I), il existe des formes associées à d'autres malformations, principalement rénales et squelettiques. Le syndrome est alors qualifié de MRKH de type II,

ou d'association MURCS (Müllerian duct aplasia, unilateral Renal aplasia, and Cervicothoracic Somite dysplasia – OMIM 601076) (Duncan *et al.*, 1979) . Longtemps considéré comme sporadique, le syndrome MRKH, qui concerne des femmes au caryotype très généralement normal 46,XX (Sarto, 1974), a toutefois été décrit sous des formes familiales (Jones and Mermut, 1972; Griffin *et al.*, 1976; Tiker *et al.*, 2000), suggérant l'existence de formes transmises du syndrome. Au sein des familles informatives décrites dans la littérature, il a été observé de fréquentes associations de l'aplasie utéro-vaginale avec des malformations rénales et squelettiques. Les malformations du tractus urinaire (le plus souvent une agénésie ou une ectopie rénale unilatérale) et les anomalies squelettiques (essentiellement cervico-thoraciques) associées concernent respectivement environ 50 % et 25 % des patientes (Griffin *et al.*, 1976). Par ailleurs, ces études familiales suggèrent une transmission génétique sur un mode dominant couplé à un degré de pénétrance incomplet et à une expressivité variable (Opitz, 1987; Pavanello Rde *et al.*, 1988).

Cette association de malformations congénitales s'explique vraisemblablement par l'origine embryologique commune des structures affectées, toutes dérivant du mésoderme intermédiaire. L'hypothèse généralement avancée pour expliquer le syndrome MRKH consiste à mettre en cause une atteinte embryonnaire précoce des blastèmes des somites cervico-thoraciques et du mésonéphros (Duncan *et al.*, 1979), lesquels ont une ultime (et intime) relation spatiale vers la fin de la quatrième semaine de vie fœtale.

## B) Revue bibliographique

Cette revue bibliographique, publiée dans le « Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction », se propose de détailler l'aspect clinique du syndrome MRKH et d'en aborder l'étiologie.

Morcel, K., Guerrier, D., Watrin, T., Pellerin, I., and Leveque, J. (2008). [The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hausner (MRKH) syndrome: clinical description and genetics]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **37**, 539-46.



Disponible en ligne sur [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



## ÉTAT DES CONNAISSANCES

# Le syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) : clinique et génétique

## The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome: Clinical description and genetics

K. Morcel<sup>a,b,\*</sup>, D. Guerrier<sup>a</sup>, T. Watrin<sup>a,b</sup>, I. Pellerin<sup>a</sup>, J. Levêque<sup>b</sup>

<sup>a</sup> CNRS UMR 6061 génétique et développement, IFR140 GFAS, faculté de médecine, université de Rennes-1, Rennes, France

<sup>b</sup> Département de gynécologie-obstétrique de médecine de la reproduction, CHU Anne-de-Bretagne, 16, boulevard de Bulgarie, BP 90437, 35203 Rennes cedex 02, France

Reçu le 7 mars 2008 ; avis du comité de lecture le 27 juin 2008 ; définitivement accepté le 8 juillet 2008

Disponible sur Internet le 23 août 2008

### MOTS CLÉS

Syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser ;  
MURCS ;  
Syndrome de DiGeorge ;  
Diagnostic différentiel ;  
Génétique

**Résumé** Le syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) est caractérisé par une aplasie congénitale de l'utérus et des deux tiers supérieurs du vagin. Elle est soit isolée (type I), soit associée à d'autres malformations (type II ou association MURCS). Ces anomalies peuvent atteindre le rein, le rachis et, dans une moindre mesure, la sphère otologique ou le cœur. L'incidence est estimée à une femme sur 4500. Le signe d'appel principal est une aménorrhée primaire. Le développement des caractères sexuels secondaires et les organes génitaux externes sont normaux. En revanche, le vagin est réduit à une cupule plus ou moins profonde. Les ovaires sont normaux et fonctionnels et le statut hormonal normal. Le caryotype est 46,XX, sans anomalie chromosomique visible. Les manifestations phénotypiques du MRKH peuvent se chevaucher avec celles d'autres syndromes ou malformations, cela requiert donc de préciser les limites de ce syndrome ainsi que les diagnostics différentiels se posant devant une femme présentant une aménorrhée primaire avec des caractères sexuels secondaires bien différenciés. Pendant longtemps, ce syndrome a été considéré comme une anomalie sporadique, mais la description de cas familiaux ont permis de mettre en cause un mécanisme génétique qui fait actuellement l'objet de recherches actives. Le mode de transmission semble être autosomique dominant à pénétrance incomplète et expression variable.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [karine.morcel@chu-rennes.fr](mailto:karine.morcel@chu-rennes.fr) (K. Morcel).



**KEYWORDS**

Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome;  
MURCS;  
DiGeorge syndrome;  
Differential diagnosis;  
genetics

**Summary** The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome is characterized by congenital aplasia of the uterus and the upper part (two-third) of the vagina. It may be isolated (type I) or associated with other malformations (type II or MURCS association). These latter involve the upper urinary tract, the skeleton and, to a lesser extent, the otologic sphere or the heart. The incidence of MRKH syndrome has been estimated as 1 in 4500 women. The prime feature is a primary amenorrhea in women presenting otherwise with normal development of secondary sexual characteristics and normal external genitalia. However, the vagina is reduced to a vaginal dimple with variable depth. The ovaries are normal and functional as well as the endocrine status. Karyotype is 46,XX, with no visible chromosome modification. The phenotypic manifestations of MRKH syndrome overlap with various other syndromes or malformations and thus require accurate delineation as well as differential diagnosis. For a long time, the syndrome has been considered as a sporadic anomaly, but increasing familial cases now support the hypothesis of a genetic cause currently under investigation. The syndrome appears to be transmitted as an autosomal dominant trait with incomplete penetrance and variable expressivity.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Définition et incidence**

Le syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) est défini par une aplasie congénitale de l'utérus et des deux tiers supérieurs du vagin chez des femmes présentant un développement normal des caractères sexuels secondaires et un caryotype normal (46,XX) [1–4].

Deux formes cliniques sont décrites :

- MRKH de type I (ou séquence de Rokitansky) : cela correspond à une agénésie utérovaginale isolée ;
- MRKH de type II (ou *mullerian duct aplasia, renal aplasia, and cervicothoracic somite dysplasia* [MURCS]) [2,5] : il s'agit alors d'une agénésie incomplète et/ou associée à d'autres malformations congénitales ; celles-ci atteignent les reins, le rachis, et plus rarement la sphère otologique, le cœur et les extrémités. Ces associations sont aussi désignées par l'acronyme GRES (*genital renal ear syndrome*).

La fréquence est d'une femme sur 4500 [6–8]. La majorité des cas semblent être sporadiques [9]. Cependant, des cas familiaux ont été décrits [8,10–12]. Le mode de transmission semble être autosomique dominant à faible pénétrance et expressivité variable [8,13,14], laissant penser que l'incidence de ce syndrome est probablement sous estimée. La séquence de Rokitansky (MRKH de type I) semble moins fréquente que le MURCS (MRKH de type II) [15] mais aucune étude n'a encore permis d'établir la fréquence relative de ces deux formes.

**Description clinique****Malformation utérovaginale**

Le premier signe d'appel est l'aménorrhée primaire, dont le MRKH est la deuxième cause après la dysgénésie gonadique [9,16]. La puberté a eu lieu normalement et les caractères sexuels secondaires sont présents (pilosité, développement mammaire de type 5 selon la classification de Tanner). On note parfois une taille plus petite que la moyenne. Les organes génitaux externes sont de type féminin [17,18]. Le

méat urétral est parfois béant et plus bas situé. Il n'y a pas d'incontinence urinaire associée. En revanche, le vagin est réduit à une cupule vaginale plus ou moins profonde. Au toucher rectal, on ne perçoit pas de structure utérine médiane.

Les ovaires sont normaux et fonctionnels [17,18]. Des cas d'ovaires polykystiques [19–21] ou de tumeurs ovariennes [22–24] chez des femmes présentant un caryotype normal 46,XX ont été décrits. L'aplasie ou l'absence de dérivés müllériens évoquant le syndrome MRKH est également retrouvée dans des cas de dysgénésie [25,26] ou d'agénésie [27,28] gonadique chez des sujets XY ou XO de phénotype féminin. Ces pathologies ovariennes ne peuvent toutefois pas intégrer la description clinique du MRKH ou du MURCS. En effet, il n'est pas retrouvé dans la littérature de séries démontrant une association significative entre ce type de pathologie et l'agénésie utérovaginale [19,25].

**Malformations associées (Tableau 1)**

Elles concernent généralement le haut appareil urinaire, le squelette, la sphère otologique. Des cas de malformations cardiaques associées ont aussi été rapportés.

**Malformations du haut appareil urinaire**

Elles sont associées à environ 50 % des cas de syndrome MRKH décrits [29]. Elles sont représentées par l'agénésie rénale unilatérale (23–28 %) [30,31] et/ou le rein en position pelvienne (17 %) [31], l'hypoplasie rénale (4 %) [31], le rein en fer à cheval et l'hydronéphrose [30].

Des cas d'agénésie rénale bilatérale (séquence de Potter) associée à une absence de l'utérus et des deux tiers supérieurs du vagin ont été décrits chez des fœtus non viables, avortés [32]. L'association de l'adysplasie rénale héréditaire (HRA) et du syndrome MRKH a d'ailleurs été suggérée [13].

**Malformations osseuses**

Elles atteignent essentiellement le rachis (20–26 %) [29,33] mais parfois aussi les extrémités et la face. Les malformations rachidiennes sont la scoliose (20 %) [30], une anomalie vertébrale (hémivertèbre, fusion vertébrale), le syndrome

**Tableau 1** Tableau récapitulatif des principales malformations associées au type II du MRKH (MURCS).  
Summary table of main associated malformations in MRKH syndrome type II (MURCS).

Organes atteints	Fréquence	Malformations
Reins	50 %	Agénésie rénale unilatérale (23–28 %) Rein en position pelvienne (17 %)
Rachis	20–26 %	Scoliose (20 %) Hémivertèbre, fusion vertébrale Syndrome de Klippel-Feil
Sphère otologique	10–25 %	Surdité de transmission
Extrémités et face	Rare	Anomalie du rayon radial Asymétrie faciale
C�eur	Rare	Trouble du rythme Shunt gauche–droit Cardiopathie conotruncale

de Klippel-Feil (fusion des vertèbres cervicales entraînant un cou court, un torticolis congénital, des cheveux bas implantés) et/ou l'anomalie de Sprengel (surélévation d'une omoplate) [34], l'agénésie ou la malformation costale, le spina bifida [33].

Au niveau des extrémités et de la face, les anomalies retrouvées sont la brachymésophalangie [35], l'ectrodactylie [36], le pouce surnuméraire [37], l'agénésie radiale [38], le syndrome de Holt-Oram (dysplasie atriodigitale) [39,40], l'asymétrie faciale [41–43].

#### Malformation de la sphère otologique

Selon les auteurs et les séries étudiées, les cas d'anomalies auditives et de surdité sont associés entre 10 et 25 % des cas de syndrome de MRKH [34,44,45] : il s'agit d'une surdité de transmission, liée à une malformation de l'oreille moyenne.

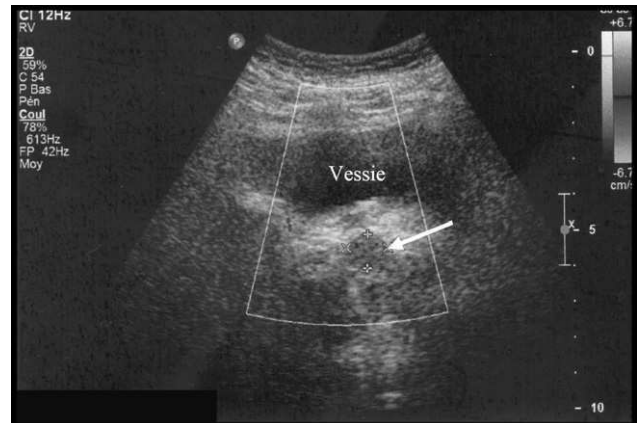
#### Malformations cardiaques

Elles ne sont qu'occasionnellement retrouvées associées au syndrome MRKH. Ce sont soit des troubles du rythme (bloc de branche droit [39]), soit un shunt gauche–droit (communication interauriculaire [40]), soit une cardiopathie conotruncale (sténose de l'artère pulmonaire [46], tétralogie de Fallot [47]).

Un bilan clinique à la recherche d'une malformation associée doit donc être réalisé. Les malformations rénales et squelettiques pouvant ne pas être symptomatiques, il faudra demander :

- une échographie abdominale, voire un uroscanner ;
- une radiographie du rachis.

En cas de signes d'appel clinique d'anomalies otologique et/ou cardiaque, ce bilan sera complété par un audiogramme et/ou une échographie cardiaque.



**Figure 1**  chographie sus-pubienne visualisant une image r trovésicale (flèche) pouvant être confondue avec un utérus hypoplasique.

*Pelvic ultrasound showing a retrovesical image (arrow) that could be confused with hypoplastic uterus.*

Par ailleurs, lors de la découverte d'un MRKH chez une patiente, il faut s'intéresser à ses ascendants et à ses frères et sœurs, en reprenant de façon ciblée les antécédents familiaux. En fonction du contexte, une exploration rénale et rachidienne pourra être demand e pour ces personnes.

## Imagerie

### L'échographie abdominale

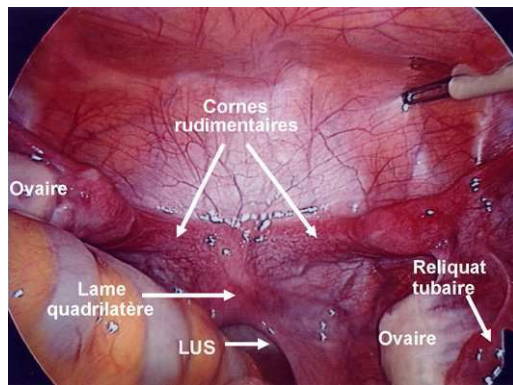
L'échographie par voie sus-pubienne est un moyen simple et non invasif de diagnostic. Elle est utilisée en première intention. Il n'est pas retrouvé de structure utérine entre la vessie et le rectum. En revanche, une structure quadrangulaire r trovésicale peut être identifiée à tort comme utérus hypoplasique (Fig. 1) : elle correspond à la lame vestigiale située sous la partie médiane du repli péritonéal transversal à la face postérieure de la vessie, où s'insèrent les ligaments ut rosacr s. Cette structure n'étant pas creusée d'une cavité, il n'est pas mis en évidence de ligne hyperéchogène, correspondant normalement à la muqueuse utérine [48].

Une malformation rénale associée doit, par ailleurs, être systématiquement recherch e au cours de cette échographie.

### L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM est un examen plus sensible et plus spécifique que l'échographie sus-pubienne. Elle permet un diagnostic précis de l'aplasie utérine, ainsi que la visualisation des cornes rudimentaires et des ovaires [49,50]. L'aplasie utérine est mieux vue en coupe sagittale alors que l'aplasie vaginale sera mieux mise en évidence en coupe transversale [51].

L'IRM permet, par ailleurs, la recherche d'autres malformations associées (rénales et osseuses).



**Figure 2** Vue coelioscopique d'une aplasie utérovaginale isolée (MRKH de type I)

LUS : ligament utérosacré.

*Coelioscopic imaging of isolated uterovaginal aplasia (type I MRKH).*

### La coelioscopie

La coelioscopie pourra être proposée en cas de doute diagnostique après IRM. Actuellement, elle est surtout envisagée lors du traitement chirurgical (création d'un néovagin). Elle montre l'absence d'utérus, des ovaires normaux, les reliquats tubaires, la lame vestigiale située sous la partie médiane du repli péritonéal transversal ainsi que les ligaments utérosacrés grêles (Fig. 2).

Sur le plan anatomique, il est alors décrit :

- soit une aplasie utérine totale (présence de deux cornes rudimentaires reliées par un repli péritonéal) avec des trompes normales, correspondant à la séquence de Rokitansky (MRKH de type I) [52] ;
- soit une hypoplasie utérine qui peut être symétrique ou asymétrique (aplasie d'une des deux cornes, différence de taille entre les deux rudiments cornuaux) associée à des anomalies tubaires (hypoplasie, aplasie d'une ou des deux trompes), correspondant à la forme atypique du MRKH (ou MRKH de type II) [29].

### Biologie

Le caryotype sanguin est normal (46,XX) sans anomalie chromosomique visible. Le bilan endocrinien

(FSH, LH et  $17\beta$ -estradiol plasmatiques) est normal, témoignant de l'intégrité de la fonction ovarienne. Il n'existe pas d'hyperandrogénie (taux plasmatiques normaux de testostérone, de delta-4-androstènedione, de 17-hydroxyprogestérone et de déhydroépiandrostérone).

### Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel se posera devant une patiente présentant une aménorrhée primaire avec des caractères sexuels secondaires bien différenciés (Tableau 2), permettant d'emblée d'exclure les dysgénésies gonadiques. Une imperforation hyménéale ou une cloison vaginale transverse peut initialement être confondues avec une aplasie vaginale mais le diagnostic sera rapidement redressé par un examen clinique attentif.

### L'atrésie vaginale isolée

À l'interrogatoire, des douleurs pelviennes cycliques sont retrouvées, liées à une cryptoménorrhée. Cette atrésie peut intégrer différents syndromes, comme le syndrome de Winter (*syndrome of renal, genital and middle ears anomalies*) [53,54], le syndrome de McKusick-Kaufman (hydrométrocolpos — polydactylie postaxiale — cardiopathie congénitale), lié à une mutation du gène *MKKS* situé en 20p12 [55].

### Le syndrome *WNT4*

À ce jour, trois cas de mutation du gène *WNT4* ont été publiés [56–58]. Le phénotype est très proche du MRKH avec une aménorrhée primaire, une aplasie utérovaginale avec éventuellement une malformation rénale. Ces anomalies sont toutefois associées à des signes d'hyperandrogénie (acné et hirsutisme), corrélés par des dosages plasmatiques montrant une testostéronémie élevée, excluant ce syndrome du spectre du MRKH [57]. Le caryotype est aussi sans anomalie visible (46,XX), notamment au niveau de la région subtélomérique p36.12 du bras court du chromosome 1 portant le gène *WNT4* [59].

### Le syndrome d'insensibilité aux androgènes

C'est un pseudohermaphrodisme masculin lié à une mutation du gène du récepteur aux androgènes. Le diagnostic

**Tableau 2** Diagnostics différentiels du MRKH.  
*Differential diagnosis of MRKH.*

	MRKH/MURCS	Atrésie vaginale isolée	Syndrome <i>WNT4</i>	Syndrome d'insensibilité aux androgènes
Vagin	Absent	Absent	Absent	Présent
Utérus	Absent	Présent	Absent	Absent
Gonades	Ovaires	Ovaires	Gonades masculinisées	Testicules
Développement mammaire	Normal	Normal	Normal	Normal
Pilosité pubienne	Normale	Normale	Normale	Peu développée
Hyperandrogénie	Non	Non	Oui	Non
Caryotype	46,XX	46,XX	46,XX	46,XY

différentiel se posera surtout lorsque l'insensibilité aux androgènes est complète. Le phénotype est féminin. En revanche, au niveau des organes génitaux internes, les dérivés Wolffiens sont insuffisamment développés, il n'y a pas de structure müllérienne et les gonades sont des testicules normalement différenciés en position abdominale ou inguinale. Le caryotype est 46,XY. Le taux de testostérone est celui attendu chez un sujet masculin.

### L'aplasie des dérivés müllériens

L'aplasie des dérivés müllériens pouvant évoquer un MRKH a été décrite en association avec une dysgénésie gonadique. Il faut souligner que ces cas rapportés concernaient des sujets présentant un caryotype anormal impliquant les chromosomes sexuels tel que des mosaïsmes (45,X/46,Xdic(X) [26], 46,XX/45,X0 [60], 46,XX/47,XXX [61]) ou des délétions (46,X,del(X)(pter → q22) [62], 46,X,i(Xq) [63]). L'origine de l'aplasie des dérivés müllériens serait alors à rapprocher d'une anomalie au niveau du chromosome X, origine très différente du MRKH.

### Étiologie

Le syndrome MRKH fut initialement considéré comme sporadique, mettant alors en cause des facteurs exogènes [64] tels que le diabète gestationnel [65] ou l'exposition à des tératogènes comme le thalidomide [2,8,30,66]. Cependant, aucune relation entre l'exposition à des facteurs tératogènes durant la grossesse ou la présence d'une pathologie gestationnelle et la naissance d'un enfant porteur de ce syndrome n'a été retrouvée sur plusieurs études épidémiologiques [65,67–69]. Même si les cas familiaux décrits par la suite ne représentent qu'environ 20% des cas [8], ils ont permis de mettre en évidence qu'une anomalie génétique transmissible peut être à la base du syndrome. En effet, l'aplasie utérovaginale est souvent associée à d'autres malformations, principalement rénales et rachidiennes. Ces dernières malformations sont aussi retrouvées isolées ou associées entre elles chez les ascendants plus ou moins éloignés de la personne probante [8,11,13,14,70]. L'aplasie utérovaginale ne serait alors qu'une des manifestations d'une anomalie génétique d'expression variable. Le mode de transmission semble donc être autosomique dominant à faible pénétrance et expressivité variable [8,13,14,70].

Sur la base d'associations pathologiques avec d'autres maladies génétiques, des gènes candidats ont d'abord été proposés. L'association MRKH avec la galactosémie, la mucoviscidose ou le diabète de type Mody a été étudiée. Il n'a pas été mis en évidence de mutation ou de délétion des gènes responsables de ces trois pathologies dans le MRKH, que ce soit le gène *galactose-1-phosphate uridyl transférase* (*GALT*, responsable de la galactosémie) [71], le gène *CFTR* [16] ou le gène *hepatocyte nuclear factor-1β* (*HNF-1β*, associé au diabète de type Mody) [72].

L'hypothèse d'une expression aberrante de l'hormone antimüllérienne et/ou de son récepteur, tous deux impliqués dans la régression des canaux de Müller chez l'embryon mâle [73], a été étudiée comme une cause du syndrome MRKH [6,74]. Cette théorie fut ensuite rejetée devant les résultats contradictoires d'une étude portant sur 22 patientes

MRKH [75]. En effet, dans cette étude, aucune mutation du gène de l'*AMH* et de son récepteur n'a été retrouvée chez ces femmes. De plus, l'existence d'ébauches de trompes, voire de trompes normales dans de nombreux cas de MRKH, atteste que la différenciation des canaux de Müller s'est bien mise en place mais n'a pas abouti dans sa totalité.

L'implication des gènes du développement embryonnaire précoce, tels que *WT1* [76], *PAX2* [77], *HOX-A7*, *-A9*, *-A10*, *-A11*, *-A13* [78,79] et *PBX1* [79], a également été évoquée, suivant l'observation des phénotypes de souris homozygotes mutantes. L'analyse de ces gènes sur différentes cohortes de patientes a conduit ensuite à les exclure. Le gène *WNT4*, autre gène du développement, a récemment été invoqué comme étant l'un des facteurs responsables du MRKH lorsqu'il était inactif. Ce gène appartient à la famille des gènes *WNT* qui régulent la croissance et la différenciation cellulaire au cours de l'embryogenèse [80]. Chez des souris femelles *WNT4*<sup>-/-</sup>, il existe une aplasie müllérienne [81]. Une mutation du gène *WNT4* a aussi été décrite chez une jeune femme de 18 ans qui présentait une aplasie müllérienne, une agénésie rénale unilatérale mais aussi une hyperandrogénie [56]. Dans ce cas pathologique, comme chez le modèle animal, il semble que l'absence de *WNT4*, indispensable à la différenciation ovarienne, a conduit à une masculinisation des gonades fœtales, provoquant une expression ectopique d'hormone antimüllérienne, responsable de la régression totale des structures müllériennes chez cette patiente. Par ailleurs, il semble que cette masculinisation gonadique soit également à l'origine d'une expression ectopique d'androgènes, dans ce même cas pathologique [56] ainsi que chez l'animal modèle [81]. Le séquençage du gène *WNT4* sur une cohorte de 19 patientes atteintes du MRKH a, par la suite, confirmé que ce gène n'était pas impliqué dans le syndrome MRKH [82]. De plus, une autre mutation du gène *WNT4* découverte chez une deuxième jeune femme a permis de conclure qu'une anomalie sur ce gène était responsable d'un nouveau syndrome différent du MRKH [57]. En effet, ce nouveau syndrome est caractérisé par une aplasie des dérivés müllériens et une hyperandrogénie, parfois associées à une malformation rénale, chez une femme présentant un caryotype 46,XX.

Actuellement, l'étiologie du syndrome MRKH n'a pas encore été cernée [78,83]. Les anomalies observées suggèrent toutefois une atteinte initiale au niveau du mésoderme intermédiaire à partir duquel se formeront, vers la fin de la quatrième semaine, les blastèmes des somites cervicothoraciques ainsi que les ébauches du tractus urogénital [2]. Ces observations permettent une première approche globale des causes du syndrome qui, en s'appuyant sur l'hypothèse d'une origine multigénique, ont déjà permis de mettre en évidence des délétions au niveau des chromosomes 22 [84], 4 [85] et 17 [86]. Nos travaux en cours sont basés sur le recoupement phénotypique observé dans environ 10% des cas entre l'association MURCS et celle du syndrome de DiGeorge ou vélocardiofacial (DGS/VCF), le plus souvent associé à une délétion 22q11 [87] et moins fréquemment à une délétion des chromosomes 4 [88], 8 [89], 10 [90] et 17 [91]. À ce jour, ces recherches sont menées dans le cadre du réseau programme de recherches sur les aplasies müllériennes (Pram), qui regroupe des gynécologues et des généticiens de nombreux CHU ainsi que des scientifiques de l'Inserm et du CNRS, permettant un maillage

national d'étude et de recherche sur cette pathologie. Nos premières investigations nous permettent de penser que le syndrome MRKH serait associé aux loci chromosomiques en cause dans le syndrome de DiGeorge (Morcel K. Génétique du syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser. In: JFROG-CNGOF, 2006:45).

## Conclusion

Devant une aménorrhée primaire chez une jeune femme présentant des caractères sexuels bien différenciés, il est important de réaliser un diagnostic le plus précis possible. La confusion possible avec d'autres syndromes incluant une anomalie utérovaginale nécessite une connaissance des différents diagnostics différentiels.

Cette notion est d'autant plus importante qu'il est désormais établi qu'il existe une composante génétique au syndrome. Au vu des derniers résultats, ce syndrome apparaît être une variable du spectre du syndrome de DiGeorge. Ces différents éléments nous amènent à attirer l'attention sur la nécessité d'un recours au conseil génétique devant le syndrome MRKH, tant pour l'information de la famille que pour les éventuels couples pouvant avoir recours à la gestation pour autrui.

## Remerciements

Nos premiers remerciements s'adressent aux associations de patientes avec qui nous travaillons: Claradoc (<http://claradoc.gpa.free.fr>), Maia (<http://www.maia-asso.org>), syndrome de Rokitansky-MRKH (<http://asso.orpha.net/MRKH>) ainsi qu'aux volontaires pour la recherche.

Nos recherches s'effectuent dans le cadre du réseau national Pram (Coordonnateur: Daniel Guerrier, [daniel.guerrier@univ-rennes1.fr](mailto:daniel.guerrier@univ-rennes1.fr)). Nous tenons à remercier l'ensemble des cliniciens qui ont permis le développement de ce réseau.

## Références

- [1] Azoury RS, Jones Jr HW. Cytogenetic findings in patients with congenital absence of the vagina. *Am J Obstet Gynecol* 1966;94:178–80.
- [2] Duncan PA, Shapiro LR, Stangel JJ, Klein RM, Addonizio JC. The MURCS association: mullerian duct aplasia, renal aplasia, and cervicothoracic somite dysplasia. *J Pediatr* 1979;95:399–402.
- [3] Leduc B, van Campenhout J, Simard R. Congenital absence of the vagina. Observations on 25 cases. *Am J Obstet Gynecol* 1968;100:512–20.
- [4] Sarto GE. Cytogenetics of fifty patients with primary amenorrhea. *Am J Obstet Gynecol* 1974;119:14–23.
- [5] Braun-Quentin C, Billes C, Bowing B, Kotzot D. MURCS association: case report and review. *J Med Genet* 1996;33:618–20.
- [6] Folch M, Pigem I, Konje JC. Mullerian agenesis: etiology, diagnosis, and management. *Obstet Gynecol Surv* 2000;55:644–9.
- [7] Varner RE, Younger JB, Blackwell RE. Mullerian dysgenesis. *J Reprod Med* 1985;30:443–50.
- [8] Griffin JE, Edwards C, Madden JD, Harrod MJ, Wilson JD. Congenital absence of the vagina. The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Ann Intern Med* 1976;85:224–36.
- [9] Carson SA, Simpson JL, Malinak LR, Elias S, Gerbie AB, Buttram VC, et al. Heritable aspects of uterine anomalies. II. Genetic analysis of Mullerian aplasia. *Fertil Steril* 1983;40:86–90.
- [10] Jones Jr HW, Mermut S. Familial occurrence of congenital absence of the vagina. *Am J Obstet Gynecol* 1972;114:1100–1.
- [11] Evans TN, Poland ML, Boving RL. Vaginal malformations. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141:910–20.
- [12] Tiker F, Yildirim SV, Barutcu O, Bagis T. Familial mullerian agenesis. *Turk J Pediatr* 2000;42:322–4.
- [13] Opitz JM. Vaginal atresia (von Mayer-Rokitansky-Kuster or MRK anomaly) in hereditary renal adysplasia (HRA). *Am J Med Genet* 1987;26:873–6.
- [14] Pavanello Rde C, Eigier A, Otto PA. Relationship between Mayer-Rokitansky-Kuster (MRK) anomaly and hereditary renal adysplasia (HRA). *Am J Med Genet* 1988;29:845–9.
- [15] Strubbe EH, Cremers CW, Willemsen WN, Rolland R, Thijn CJ. The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome without and with associated features: two separate entities? *Clin Dysmorphol* 1994;3:192–9.
- [16] Timmreck LS, Gray MR, Handelin B, Allito B, Rohlfs E, Davis AJ, et al. Analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in patients with congenital absence of the uterus and vagina. *Am J Med Genet A* 2003;120A:72–6.
- [17] Fraser IS, Baird DT, Hobson BM, Michie EA, Hunter W. Cyclical ovarian function in women with congenital absence of the uterus and vagina. *J Clin Endocrinol Metab* 1973;36:634–7.
- [18] Shane JM, Wilson EA, Schiff I, Naftolin F. A preliminary report on gonadotropin responsivity in the Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome (congenitally absent uterus). *Am J Obstet Gynecol* 1977;127:326–7.
- [19] Ugur M, Karakaya S, Zorlu G, Arslan S, Gulerman C, Kukner S, et al. Polycystic ovaries in association with mullerian anomalies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995;62:57–9.
- [20] Appelman Z, Hazan Y, Hagay Z. High prevalence of mullerian anomalies diagnosed by ultrasound in women with polycystic ovaries. *J Reprod Med* 2003;48:362–4.
- [21] Raybaud C, Richard O, Arzim M, David M. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: associated pathologies. *Arch Pediatr* 2001;8:1209–13.
- [22] Ghirardini G, Magnani A. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome and ovarian cancer. Report of a case. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1995;22:247–8.
- [23] Rodriguez E, Pombo F, Alvarez C, Arnal F. Tumor in ectopic omental ovary in Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: CT findings. *J Comput Assist Tomogr* 1998;22:758–9.
- [24] Tsaour GT, Lee MH, Su SL, Wu MJ, Huang TW. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome with immature teratoma of the ovary at age 4 years. *Gynecol Oncol* 1995;56:456–9.
- [25] Marrakchi A, Belhaj L, Boussof H, Chraïbi A, Kadiri A. Pure gonadal dysgenesis XX and XY: observations in fifteen patients. *Ann Endocrinol (Paris)* 2005;66:553–6.
- [26] Guitron-Cantu A, Lopez-Vera E, Forsbach-Sanchez G, Leal-Garza CH, Cortes-Gutierrez EI, Gonzalez-Pico I. Gonadal dysgenesis and Rokitansky syndrome. A case report. *J Reprod Med* 1999;44:891–3.
- [27] Kaya H, Sezik M, Ozkaya O, Kose SA. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome associated with unilateral gonadal agenesis. A case report. *J Reprod Med* 2003;48:902–4.
- [28] Gorgojo JJ, Almodovar F, Lopez E, Donnay S. Gonadal agenesis 46,XX associated with the atypical form of Rokitansky syndrome. *Fertil Steril* 2002;77:185–7.
- [29] Strubbe EH, Willemsen WN, Lemmens JA, Thijn CJ, Rolland R. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: distinction between two forms based on excretory urographic, sonographic, and laparoscopic findings. *AJR Am J Roentgenol* 1993;160:331–4.
- [30] Pittcock ST, Babovic-Vuksanovic D, Lteif A. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser anomaly and its associated malformations. *Am J Med Genet A* 2005;135:314–6.

- [31] Oppelt P, Renner SP, Kellermann A, Brucker S, Hauser GA, Ludwig KS, et al. Clinical aspects of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: recommendations for clinical diagnosis and staging. *Hum Reprod* 2006;21:792–7.
- [32] Devriendt K, Moerman P, Van Schoubroeck D, Vandenberghe K, Fryns JP. Chromosome 22q11 deletion presenting as the Potter sequence. *J Med Genet* 1997;34:423–5.
- [33] Strubbe EH, Lemmens JA, Thijn CJ, Willemsen WN, van Toor BS. Spinal abnormalities and the atypical form of the Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Skeletal Radiol* 1992;21:459–62.
- [34] Cremers CW, Strubbe EH, Willemsen WN. Stapedial ankylosis in the Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:800–3.
- [35] Strubbe EH, Thijn CJ, Willemsen WN, Lappohn R. Evaluation of radiographic abnormalities of the hand in patients with the Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Skeletal Radiol* 1987;16:227–31.
- [36] Massafra C, Bartolozzi M, Bartolozzi P, Scillone L. Rokitansky-Küster-Hauser syndrome with ectrodactyly. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1988;67:557–60.
- [37] Lopez AG, Fryns JP, Devriendt K. MURCS association with duplicated thumb. *Clin Genet* 2002;61:308–9.
- [38] Behera M, Couchman G, Walmer D, Price TM. Mullerian agenesis and thrombocytopenia absent radius syndrome: a case report and review of syndromes associated with Mullerian agenesis. *Obstet Gynecol Surv* 2005;60:453–61.
- [39] Ulrich U, Schrickel J, Dorn C, Richter O, Lewalter T, Luderitz B, et al. Mayer-von Rokitansky-Küster-Hauser syndrome in association with a hitherto undescribed variant of the Holt-Oram syndrome with an aorto-pulmonary window. *Hum Reprod* 2004;19:1201–3.
- [40] Fakih MH, Williamson HO, Seymour EQ, Pai S. Concurrence of the Holt-Oram syndrome and the Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. A case report. *J Reprod Med* 1987;32:549–50.
- [41] Wulfsberg EA, Grigby TM. Rokitansky sequence in association with the facio-auriculo-vertebral sequence: part of a mesodermal malformation spectrum? *Am J Med Genet* 1990;37:100–2.
- [42] van Bever Y, van den Ende JJ, Richieri-Costa A. Oculo-auriculo-vertebral complex and uncommon associated anomalies: report on 8 unrelated Brazilian patients. *Am J Med Genet* 1992;44:683–90.
- [43] Pillay K, Matthews LS, Wainwright HC. Facio-auriculo-vertebral sequence in association with DiGeorge sequence, Rokitansky sequence, and Dandy-Walker malformation: case report. *Pediatr Dev Pathol* 2003;6:355–60.
- [44] Strubbe EH, Cremers CW, Dijkers FG, Willemsen WN. Hearing loss and the Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Am J Otol* 1994;15:431–6.
- [45] Letterie GS, Vauss N. Mullerian tract abnormalities and associated auditory defects. *J Reprod Med* 1991;36:765–8.
- [46] Kula S, Saygili A, Tunaoglu FS, Olgunturk R. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome associated with pulmonary stenosis. *Acta Paediatr* 2004;93:570–2.
- [47] M LG, Shulman LP. Tetralogy of Fallot, imperforate anus, and Mullerian, renal, and cervical spine (MURCS) anomalies in a 15-year-old girl. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2002; 15: 231–3.
- [48] Paniel BJ, Haddad B, el Medjadji M, Vincent Y. Value of ultrasonography in utero-vaginal aplasia. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1996;25:128–30.
- [49] Maubon A, Ferru JM, Courtieu C, Mares P, Rouanet JP. Gynecological malformations. Classification and contribution of different imaging methods. *J Radiol* 1996;77:465–75.
- [50] Carrington BM, Hricak H, Nuruddin RN, Secaf E, Laros Jr RK, Hill EC. Mullerian duct anomalies: MR imaging evaluation. *Radiology* 1990;176:715–20.
- [51] Troiano RN, McCarthy SM. Mullerian duct anomalies: imaging and clinical issues. *Radiology* 2004;233:19–34.
- [52] Jones KL. Rokitansky sequence. In: Saunders WB, editor. *Smith's recognizable patterns of human malformations*. 4th ed. Philadelphia; 1988. p. 570–1.
- [53] Winter JS, Kohn G, Mellman WJ, Wagner S. A familial syndrome of renal, genital, and middle ear anomalies. *J Pediatr* 1968;72:88–93.
- [54] King LA, Sanchez-Ramos L, Talledo OE, Reindollar RH. Syndrome of genital, renal, and middle ear anomalies: a third family and report of a pregnancy. *Obstet Gynecol* 1987;69:491–3.
- [55] Slavotinek AM, Searby C, Al-Gazali L, Hennekam RC, Schrandt-Stumpel C, Orcana-Losa M, et al. Mutation analysis of the MKKS gene in McKusick-Kaufman syndrome and selected Bardet-Biedl syndrome patients. *Hum Genet* 2002;110:561–7.
- [56] Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ. A *WNT4* mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med* 2004;351:792–8.
- [57] Biason-Lauber A, De Filippo G, Konrad D, Scarano G, Nazzaro A, Schoenle EJ. *WNT4* deficiency: a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a case report. *Hum Reprod* 2007;22:224–9.
- [58] Philibert P, Biason-Lauber A, Rouzier R, Pienkowski C, Paris F, Konrad D, et al. Identification and functional analysis of a new *WNT4* gene mutation among 28 adolescent girls with primary amenorrhea and mullerian duct abnormalities: a French collaborative study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:895–900.
- [59] Peltoketo H, Allinen M, Vuosku J, Kujala S, Lundan T, Salminen A, et al. Characterization and expression of the human *WNT4*; lack of associated germline mutations in high-to moderate-risk breast and ovarian cancer. *Cancer Lett* 2004;213:83–90.
- [60] Gardo S, Papp Z, Gaal J. XO-XX Mosaicism in the Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Lancet* 1971;2:1380–1.
- [61] Linquette M, Gasnault JP, Dupont-Lecompte J, Lefebvre J. A case of utero-vaginal aplasia with polycystic kidney and mosaicism XX=XXX. *Bull Fed Soc Gynecol Obstet Lang Fr* 1968;20:26–8.
- [62] Aydos S, Tukun A, Bokesoy I. Gonadal dysgenesis and the Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome in a girl with 46,X,del(X)(pter->q22:). *Arch Gynecol Obstet* 2003;267:173–4.
- [63] De Leon FD, Hersh JH, Sanfilippo JS, Schikler KN, Yen FF. Gonadal and mullerian duct agenesis in a girl with 46,X,i(Xq). *Obstet Gynecol* 1984;63:815–35.
- [64] Simpson JL. Genetics of the female reproductive ducts. *Am J Med Genet* 1999;89:224–39.
- [65] Martinez-Frias ML. Epidemiological analysis of outcomes of pregnancy in diabetic mothers: identification of the most characteristic and most frequent congenital anomalies. *Am J Med Genet* 1994;51:108–13.
- [66] Hoffmann W, Grospietsch G, Kuhn W. Thalidomide and female genital malformations. *Lancet* 1976;2:794.
- [67] Martinez-Frias ML, Bermejo E, Rodriguez-Pinilla E, Prieto L, Frias JL. Epidemiological analysis of outcomes of pregnancy in gestational diabetic mothers. *Am J Med Genet* 1998;78:140–5.
- [68] Schinzel A. Phocomelia and additional anomalies in two sisters. *Hum Genet* 1990;84:539–41.
- [69] Steinkampf MP, Dharia SP, Dickerson RD. Monozygotic twins discordant for vaginal agenesis and bilateral tibial longitudinal deficiency. *Fertil Steril* 2003;80:643–5.
- [70] Karam KS, Salti I, Hajj SN. Congenital absence of the uterus. Clinicopathologic and endocrine findings. *Obstet Gynecol* 1977;50:531–5.
- [71] Klipstein S, Bhagavath B, Topipat C, Sasur L, Reindollar RH, Gray MR. The N314D polymorphism of the *GALT* gene is not associated with congenital absence of the uterus and vagina. *Mol Hum Reprod* 2003;9:171–4.
- [72] Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, et al. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (*TCF2*) associated with Mody. *Nat Genet* 1997;17:384–5.

- [73] Josso N, Picard JY, Rey R, di Clemente N. Testicular anti-Mullerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. *Pediatr Endocrinol Rev* 2006;3:347–58.
- [74] Lindenman E, Shepard MK, Pescovitz OH. Mullerian agenesis: an update. *Obstet Gynecol* 1997;90:307–12.
- [75] Resendes BL, Sohn SH, Stelling JR, Tineo R, Davis AJ, Gray MR, et al. Role for anti-Mullerian hormone in congenital absence of the uterus and vagina. *Am J Med Genet* 2001;98:129–36.
- [76] van Lingen BL, Reindollar RH, Davis AJ, Gray MR. Further evidence that the *WT1* gene does not have a role in the development of the derivatives of the mullerian duct. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:597–603.
- [77] van Lingen BL, Reindollar RH, Davis AJ, Gray MR. Molecular genetic analysis of the *PAX2* gene in patients with congenital absence of the uterus and vagina. *Fertil Steril* 1998;70:S402 [abstract].
- [78] Guerrier D, Mouchel T, Pasquier L, Pellerin I. The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome (congenital absence of uterus and vagina)—phenotypic manifestations and genetic approaches. *J Negat Results Biomed* 2006;5:1.
- [79] Burel A, Mouchel T, Odent S, Tiker F, Knebelmann B, Pellerin I, et al. Role of *HOXA7* to *HOXA13* and *PBX1* genes in various forms of MRKH syndrome (congenital absence of uterus and vagina). *J Negat Results Biomed* 2006;5:4.
- [80] Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus. *Science* 2000;287:1606–9.
- [81] Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by *Wnt-4* signalling. *Nature* 1999;397:405–9.
- [82] Clement-Ziza M, Khen N, Gonzales J, Cretolle-Vastel C, Picard JY, Tullio-Pelet A, et al. Exclusion of *WNT4* as a major gene in Rokitansky-Kuster-Hauser anomaly. *Am J Med Genet A* 2005;137:98–9.
- [83] Kobayashi A, Behringer RR. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat Rev Genet* 2003;4:969–80.
- [84] Cheroki C, Krepischi-Santos AC, Rosenberg C, Jehée FS, Mingroni-Netto RC, Pavanello Filho I, et al. Report of a del22q11 in a patient with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) anomaly and exclusion of *WNT-4*, *RAR-gamma*, and *RXR-alpha* as major genes determining MRKH anomaly in a study of 25 affected women. *Am J Med Genet A* 2006;140:1339–42.
- [85] Bendavid C, Pasquier L, Watrin T, Morcel K, Lucas J, Gicquel I, et al. Phenotypic variability of a 4q34->qter inherited deletion: MRKH syndrome in the daughter, cardiac defect and Fallopian tube cancer in the mother. *Eur J Med Genet* 2007;50:66–72.
- [86] Cheroki C, Krepischi-Santos AC, Szuhai K, Brenner V, Kim CA, Otto PA, et al. Genomic imbalances associated with mullerian aplasia. *J Med Genet* 2008;45:228–32.
- [87] Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11. 2 deletion syndromes. *Lancet* 2007;370:1443–52.
- [88] Tsai CH, Van Dyke DL, Feldman GL. Child with velocardiofacial syndrome and del (4)(q34.2): another critical region associated with a velocardiofacial syndrome-like phenotype. *Am J Med Genet* 1999;82:336–9.
- [89] Devriendt K, De Mars K, De Cock P, Gewillig M, Fryns JP. Terminal deletion in chromosome region 8p23.1-8pter in a child with features of velo-cardio-facial syndrome. *Ann Genet* 1995;38:228–30.
- [90] Schuffenhauer S, Seidel H, Oechler H, Belohradsky B, Bernsau U, Murken J, et al. DiGeorge syndrome and partial monosomy 10p: case report and review. *Ann Genet* 1995;38:162–7.
- [91] Greenberg F, Courtney KB, Wessels RA, Huhta J, Carpenter RJ, Rich DC, et al. Prenatal diagnosis of deletion 17p13 associated with DiGeorge anomaly. *Am J Med Genet* 1988;31:1–4.

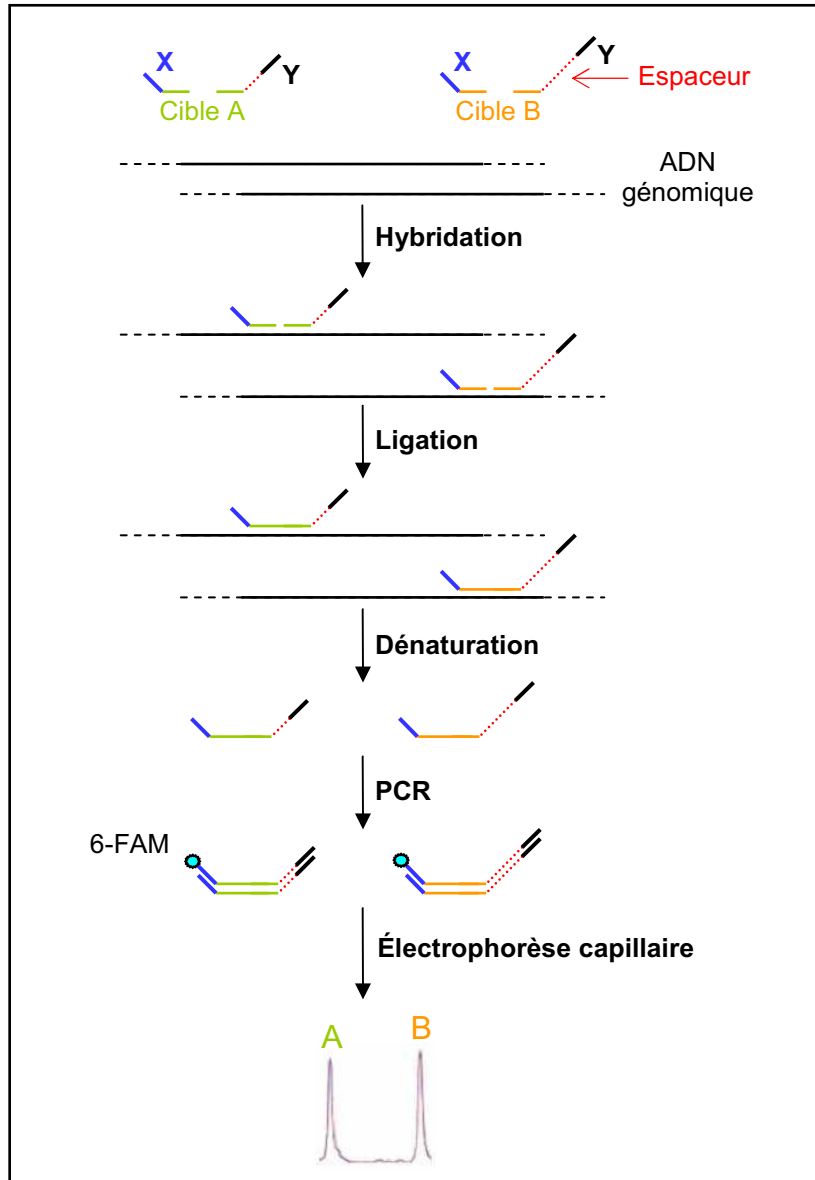
### III. Recherche des causes génétiques du syndrome MRKH

#### A) Contexte scientifique de l'étude

L'approche par gènes candidats s'étant révélée jusqu'à présent infructueuse - aucun gène n'ayant été clairement impliqué dans la manifestation du syndrome MRKH - la stratégie de recherche mise en œuvre dans mon équipe consiste en l'étude à grande échelle de patientes atteintes de ce syndrome *via* des méthodes d'exploration du génome plus globales. Les patientes volontaires pour participer à cette étude sont recrutées dans le cadre d'un réseau national de recherches cliniques : le réseau PRAM (Programme de Recherches sur les Aplasies Müllériennes). Initialement créé à Rennes, il regroupe désormais des praticiens hospitaliers (gynécologues et généticiens) de nombreux CHU, le Centre de Ressources Biologiques Humaines de Rennes, les services de Génétique Moléculaire et de Cytogénétique du CHU Pontchaillou de Rennes, les deux seules associations de patientes MRKH en France (MAIA et syndrome de Rokitansky-MRKH) ainsi que notre groupe de recherche.

A la lecture des données cliniques de chacune des patientes MRKH participant à cette étude, il a été constaté qu'environ 10 % d'entre elles présentent des malformations appartenant au spectre d'une autre pathologie malformative congénitale, le syndrome de DiGeorge (DiGeorge Syndrome, DGS - OMIM 188400) : adysplasies rénales et anomalies squelettiques principalement, mais aussi malformations cardiaques et surdité. D'une incidence proche de 1/4000, le DGS est l'un des désordres génétiques les plus fréquents chez l'Homme et est imputable, dans la très grande majorité des cas, à une délétion hémizygote de la région 22q11.21 (Driscoll *et al.*, 1992). Il est à noter que d'autres syndromes malformatifs voisins du DGS mais cliniquement distincts, tel le syndrome vélocardiofacial (OMIM 192430), sont également associés à une délétion hémizygote de cette région. La dénomination « chromosome 22q11.2 deletion syndromes » est parfois utilisée par les généticiens puisqu'elle intègre la notion de diagnostic cytogénétique (et non plus phénotypique) ainsi que la très grande hétérogénéité clinique observée. Alors que 80 à 90 % des cas de DGS sont associés à une délétion interstitielle hémizygote de la région 22q11.21 (Thomas and Graham, 1997; Cuneo, 2001), d'autres délétions chromosomiques, bien que plus rares, ont été identifiées. Celles-ci affectent les régions 4q34.2-qter (Tsai *et al.*, 1999), 8p23-pter (Devriendt *et al.*, 1995; Devriendt *et al.*, 1999), 10p14-p15 (Schuffenhauer *et al.*, 1995), 17p13 (Greenberg *et al.*, 1988a) et 18q21 (Greenberg *et al.*, 1988b).





**Figure 21. Principe de la technique de MLPA.** L'ADN génomique testé est dénaturé puis mis en présence d'un mélange de sondes, chacune étant composée de deux oligonucléotides s'hybridant à des séquences cibles adjacentes. Après ligation des deux fragments de chaque sondes, les produits résultants sont amplifiés par PCR à l'aide d'un seul couple d'amorces universelles spécifiques des régions X et Y communes à toutes les sondes. Le marquage terminal de l'une de ces amorces par un fluorochrome (6-FAM) permet, après séparation par électrophorèse capillaire, de quantifier les produits d'amplification obtenus. Des aires sous le pic relatives réduites d'environ 50 % sont le reflet de microdélétions hémizygotiques. A l'inverse, des duplications augmenteront ces valeurs d'environ 50 %.

Outre des malformations cardiaques, rénales et squelettiques, les individus atteints par le DGS peuvent présenter plusieurs autres caractéristiques cliniques remarquables parmi lesquelles : hypocalcémie par hypoparathyroïdie, déficit immunitaire par aplasie/hypoplasie thymique, fente palatine, retard mental. Un cas d'aplasie utéro-vaginale associée à un défaut d'apprentissage, chez une femme souffrant en outre d'une hypothyroïdie, a d'ailleurs été rapporté dans la littérature (Cheroki *et al.*, 2006), soulignant la diversité des atteintes phénotypiques constatées dans le DGS.

Le recouvrement constaté des spectres de malformations du syndrome MRKH et du DGS nous a conduits à formuler l'hypothèse selon laquelle ces deux syndromes sont étiologiquement liés. Une recherche systématique d'anomalies du nombre de copies des régions génomiques décrites dans la littérature comme associées au DGS (voir ci-dessus) a été menée sur notre cohorte de patientes MRKH afin de tester cette hypothèse. Ce criblage préliminaire de loci candidats repose sur la mise en œuvre d'une technique de dosage génique dénommée MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) (Schouten *et al.*, 2002). Cette technique, donnant accès au nombre de copies de 40 régions génomiques cibles en une seule réaction, permet la détection rapide d'événements de délétion ou de duplication simultanément en de multiples loci chromosomiques du génome d'un individu (**Figure 21**).

Cette approche nous a permis de caractériser, chez 4 individus non apparentés, 4 délétions hémizygotiques au sein des 4 régions les plus communément impliquées dans le DGS : 4q34-qter, 8p23, 10p14-15.1 et 22q11.2. Les deux articles qui suivent exposent de façon plus détaillée ces résultats.

## B) Publications

### 1) Identification d'une délétion d'origine maternelle de la région 4q34-qter chez une patiente MRKH : une illustration de l'expressivité variable

Cet article fait état de la première microdélétion identifiée chez une patiente MRKH de notre cohorte. Héritée de sa mère qui présente un phénotype très différent, elle reflète l'expressivité très variable du syndrome MRKH.

Bendavid, C., Pasquier, L., Watrin, T., Morcel, K., Lucas, J., Gicquel, I., Dubourg, C., Henry, C., David, V., Odent, S., Leveque, J., Pellerin, I., and Guerrier, D. (2007). Phenotypic variability of a 4q34→qter inherited deletion: MRKH syndrome in the daughter, cardiac defect and Fallopian tube cancer in the mother. *Eur J Med Genet* **50**, 66-72.



Short report

Phenotypic variability of a 4q34 → qter inherited deletion: MRKH syndrome in the daughter, cardiac defect and Fallopian tube cancer in the mother

Claude Bendavid<sup>a,b</sup>, Laurent Pasquier<sup>c</sup>, Tanguy Watrin<sup>a</sup>,  
Karine Morcel<sup>a,d</sup>, Josette Lucas<sup>e</sup>, Isabelle Gicquel<sup>a</sup>,  
Christèle Dubourg<sup>a,b</sup>, Catherine Henry<sup>e</sup>,  
Véronique David<sup>a,b</sup>, Sylvie Odent<sup>c</sup>,  
Jean Levêque<sup>d</sup>, Isabelle Pellerin<sup>a</sup>, Daniel Guerrier<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> CNRS UMR 6061, Génétique et Développement, Université de Rennes 1, IFR140 GFAS, Faculté de Médecine, 2, avenue du Professeur Leon Bernard, Rennes 35043, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Génétique Moléculaire et Hormonologie, CHU de Pontchaillou, Rennes, France

<sup>c</sup> Unité de Génétique Médicale, Hôpital Sud, Rennes, France

<sup>d</sup> Département d'Obstétrique, Gynécologie et Médecine de la Reproduction Hôpital Sud, Rennes, France

<sup>e</sup> Laboratoire de Cytogénétique et Biologie Cellulaire, CHU de Pontchaillou, Rennes, France

Received 27 July 2006; accepted 20 September 2006

Available online 1 October 2006

**Abstract**

Terminal deletions of the long arm of chromosome 4 are associated with a recognizable phenotype consisting of dysmorphic facial features, cleft palate, upper and lower limb malformations, cardiac defects and growth and mental retardation. Here we report on two female patients, a mother and her daughter, carrying the same 4q34 → qter deletion but presenting with a different phenotype. The mother's presentation is consistent with previous findings in patients with terminal deletions of the long arm of chromosome 4. However, she presented at the age of 54 years with bilateral serous carcinoma of the Fallopian tubes, a rare gynaecologic cancer that might be attributed to the haploinsufficiency of the tumor suppressor

\* Corresponding author. Tel.: +33 (0) 2 2323 4679; fax: +33 (0) 2 2323 4478.  
E-mail address: [daniel.guerrier@univ-rennes1.fr](mailto:daniel.guerrier@univ-rennes1.fr) (D. Guerrier).

gene *FAT*. The daughter presented isolated congenital aplasia of the uterus and vagina, the prime feature of the MRKH syndrome. This has not been described before in association with a 46,XX,del(4)(q34qter). © 2006 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

*Keywords:* 4q34 terminal deletion; 4q-syndrome; Atrial septal defect; Fallopian tube serous carcinoma; *FAT*; MRKH syndrome

---

## 1. Introduction

Terminal deletions of the long arm of chromosome 4 are associated with a recognizable phenotype, the severity of which correlates with the position of the chromosomal breakpoints [1–4]. Deletions of 4q31, 4q32 and 4q33 → qter lead to a distinctive malformation syndrome (4q- syndrome) including a varying degree of learning disability, growth deficiency, cleft palate, limb abnormalities, external genitourinary anomalies and cardiac defects [1,5,6]. The critical deletion region has been assigned to 4q33 [7]. More distal 4q deletions involving bands 4q34–4q35 are less common and have been found in patients presenting with less typical dysmorphic features and milder or absent learning disabilities [6,8]. Nevertheless, small terminal deletions of the segment 4q34.2 to 4qter may lead to phenotypic manifestations similar to velocardiofacial syndrome, including congenital heart defects, cleft palate and learning difficulties [6]. However, internal genital anomalies such as those found in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome have never been observed [9].

In women presenting with primary amenorrhea, the MRKH syndrome is fairly common, being second only to gonadal dysgenesis [10,11]. It occurs with a frequency varying from 1 in 4000 to 5000 female births [12–14]. The MRKH syndrome is characterized by congenital aplasia of the uterus and vagina and is often associated with other malformations such as dysplasia of the Fallopian tubes, renal defects, cervico-thoracic (Klippel-Feil) anomalies, facial asymmetry, hearing impairment, digital anomalies, cleft lip and palate and heart malformations [9,12,15,16]. It is then generally referred to as the MURCS (Müllerian Renal Cervical Somite) association [17,18] (OMIM 601076).

## 2. Clinical reports

The proband presented with primary amenorrhoea, leading to the diagnosis of congenital absence of upper vagina and uterus. Bilaterally normal ovaria were seen on laparoscopy. Her development was normal. Thelarche and pubarche occurred at a normal age. Ultrasound of the heart and kidneys was normal. There is no hearing loss, no skeletal anomaly and the limbs are normal. Height is 165 cm. She followed regular schooling but is currently unemployed.

She is the only daughter of non-consanguineous parents. The mother had one miscarriage. Her father's medical history is unremarkable. Her mother, now 56 years, is 152 cm. At birth, she had an equinovarus (clubfoot) deformity of both feet. Later, an atrial septal defect (ostium secundum type) was detected which needed surgical repair at age 23. Bilateral serous carcinoma of the Fallopian tubes was diagnosed at age 54. She has no renal defects nor clinical signs of skeletal anomalies. Family history is negative with regard to congenital malformations and mental handicap.

### 3. Experimental investigations

Given the presence of a heart defect in the mother and some resemblance between MURCS association and the DiGeorge syndrome (DGS) [9], we orientated our analysis in search of chromosomal anomalies similar to those described in patients showing DGS-like phenotypes [6]. In a first attempt, we used the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) technique [19], using the SALSA P023 DiGeorge MLPA kit (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands). This led to finding of a 4qter subtelomeric deletion. A single copy of the *KLKB1*, *CASP3* and *ODZ3* genes, located within chromosome 4q35.1 was detected (Fig. 1C)

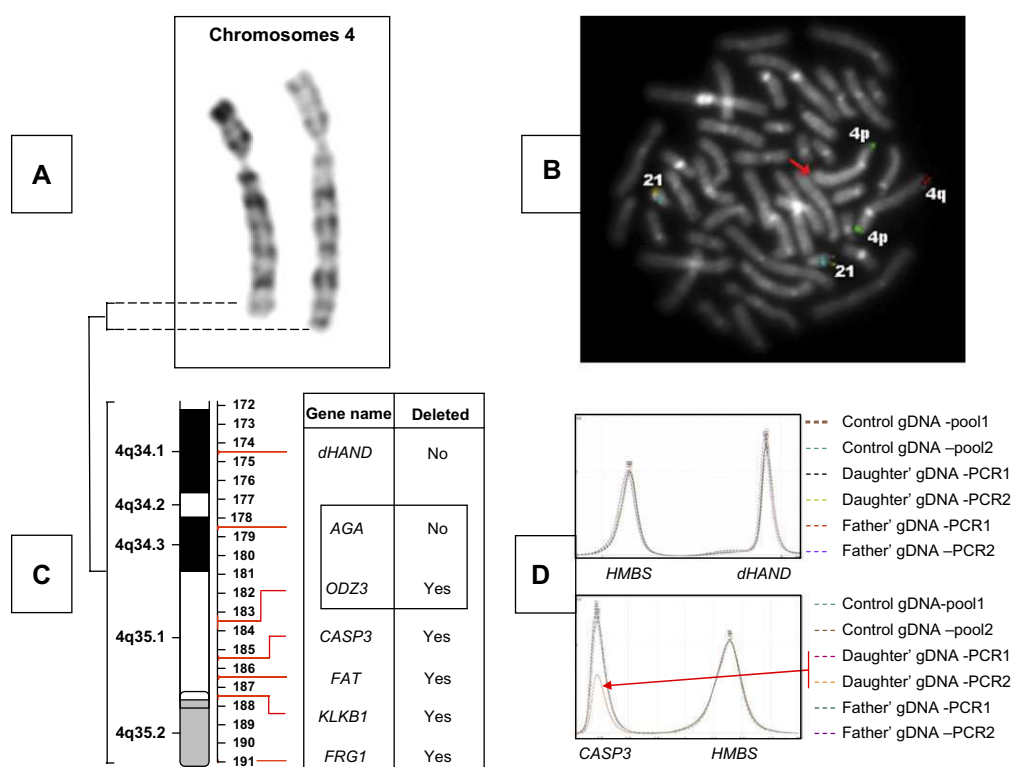


Fig. 1. (A) High-resolution banding partial karyotype (RBG technique) revealing a terminal deletion of chromosome 4q (left): 46, XX, del(4)(q?34). Images were captured on a Zeiss Axioplan microscope (Zeiss, Jena, Germany) with the IKAROS and ISIS digital imaging systems (Metasystem, Altlußheim, Germany). (B) FISH imaging: ToTelVysion Probe Panel Mixture 4 hybridized to metaphase cells. Mixture 4 contains TelVysion 4p SpectrumGreen (green), TelVysion 4q Spectrum Orange (red), TelVysion 21q SpectrumOrange/21q SpectrumGreen (mix appears as yellow) and AML (21q22) SpectrumAqua (cyan). 4q probe is deleted (red arrow) resulting in: 46,XX,del(4)(q?34).fish del(4)(q?34)(D4S2930-). (C) Summary of gene quantification and chromosome breakpoint refinement: several genes were tested through Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) [19] and multiplex PCR/liquid chromatography [20]. Results taken together show the loss of one allele (*ODZ3*, *CASP3*, *FAT*, *KLKB1*, *FRG1*) or not (*AGA*, *dHAND*). The breakpoint region located in 4q34.3–4q35.1, between *AGA* and *ODZ3* genes, is squared. (D) Example of results obtained with duplex assays using multiplex PCR/liquid chromatography method to quantify *dHAND*, *AGA* and *CASP3* gene copy number. In these experiments, two pools of 5 independent genomic DNAs were used as standards and the hydroxymethylbilane synthase (*HMBS*) gene, located at 11q23.2-qter, was used as an internal control. Red arrow shows the half dosage of the *CASP3* gene in the daughter.

whereas two copies of the *ABCG2*, *BMPRI1B* and *NFKB1* genes (respectively at 4q22.1, 4q22.3 and 4q24) were found in the same experiment (not shown). By means of the SALSA P070 Human Telomere MLPA kit, we confirmed this result. A single copy of the *FRG1* gene was detected, located 0.2 Megabase from the 4q telomere (Fig. 1C) without other associated subtelomeric gains or losses. Identical results were obtained in the mother and her daughter. The presence of a telomeric deletion of the long arm of one of the chromosomes 4 in the daughter was confirmed by chromosome analysis in peripheral white blood cells after high-resolution RBG banding, (Fig. 1A) and telomere-specific multicolour fluorescence *in situ* hybridization to metaphase cells. The karyotype therefore is 46, XX, del(4)(q?34).fish del(4)(q?34)(D4S2930-). The chromosomal breakpoint was mapped precisely using multiplex PCR/liquid chromatography [20] in a duplex assay (Fig. 1D), between the *AGA* (not deleted) and *ODZ3* (deleted) genes, located in a region from 178.5 to 185.5 Mb, between 4q34 and 4q35.1 (Fig. 1C). Fig. 1D shows the evaluation of the copy number of the *dHAND* and *CASP3* genes in the daughter's genomic DNA versus that of the father. Identical results were obtained for the mother compared to the father in two independent reactions.

#### 4. Discussion

We report on two female patients, a mother and her daughter, both carrying the same 4q34 → qter deletion. Not only do they present with very different phenotypes, but they have manifestations not been previously described in this specific deletion.

Congenital cardiac defects have been described in association with a terminal deletion of the long arm of chromosome 4 [1,6,21], and might be related to haploinsufficiency for *dHAND* [22], a gene encoding a basic helix-loop-helix transcription factor expressed in the developing heart [23]. However, as reported before, since the mother in the present report had an ASDII but *dHAND* was not included in the 4q34 → qter deletion, this gene does not seem to be the only explanation for the cardiac defects [22].

The bilateral serous carcinoma of the Fallopian tubes, discovered in this patient when she was 54, also raises the question whether this is related to the 4q deletion. The median age of diagnosis for serous carcinoma of the Fallopian tube ranges from 54 [24] to 60–64 years [25], not different from the age of this patient. Malignant neoplasms of the Fallopian tube are amongst the rarest of the gynaecologic cancers [26,27] and have never been associated with chromosome abnormalities, so far. However, other types of Müllerian derivatives carcinomas have already been described associated with terminal deletions of the long arm of chromosome 4. More specially, a region for a putative senescence gene or genes at 4q35.1-qter was recently identified as involved in cervical carcinogenesis [28]. This is reinforced by loss of heterozygosity analyses indicating the presence of tumor suppressor genes in this region [29–31]. The *FAT tumor suppressor 1 (FAT)* gene [32] lies in this region, more precisely in the 4q35.2 cytogenetic subband, adjacent to the telomere. This suggests that haploinsufficiency of the *FAT* gene might account for the bilateral Fallopian tube serous carcinoma in this patient. Chromosome 4 telomeric analysis of a significant cohort of patients with such neoplasms as well as clinical follow-up of patients with a 4q deletion might provide further information.

The proband has an absent uterus and absent upper part of the vagina, the characteristic features of the MRKH syndrome [12] (Table 1). Two types are distinguished: type I corresponds to isolated utero-vaginal aplasia whereas the more frequent type II, is characterized by the

Table 1

Clinical presentation of proband and mother in comparison with malformations or impairments described in MRKH and 4q-syndrome

	Proband	Mother	MRKH syndrome	4q-syndrome
Utero-vaginal aplasia	<b>Yes</b>	No	Common	Absent (*)
Heart malformations	No	<b>Yes</b>	Rare	Common
Facial dysmorphisms	No	No	Rare	Common
Renal anomalies	No	No	Common	Rare
Developmental delay	No	No	Absent	Common
Learning disability	No	No	Rare	Common
Hearing impairment	No	No	Common	Common
Vertebral defects	No	No	Common	Rare
Limb defects	No	No	Rare	Common
Unilateral clubfoot	No	No	Absent	Rare
Bilateral clubfeet	No	<b>Yes</b>	Absent	Rare
Gynaecologic cancer	No	<b>Yes</b>	Absent	Absent (*)

Those observed in the proband or her mother appear in bold. (\*) means not reported before.

association of utero-vaginal aplasia with renal adysplasia and skeletal abnormalities, and, less frequently, hearing defects, cleft lip/palate and cardiac malformations [9,15–17]. This condition is generally referred to as the MURCS (Müllerian Renal Cervical Somite) association [17,33]. The clinical presentation of the MRKH association has suggested either a multifactorial/polygenic inheritance and/or *de novo* mutation, undetectable by standard karyotype [9]. No cause for this association is known, but the present finding points to a possible role of one or more genes in the terminal 4q region. However, of the more than 200 genes in the 4q34 → qter region, none has been associated either with Müllerian duct differentiation or with any kind of female genital tract abnormality. The *FAT* gene [32] appears to be also a putative candidate gene for a developmental failure of Müllerian duct differentiation. The protein encoded by this gene is implicated in developmental processes requiring cell polarization [34], cell-cell interactions [35] and epithelium-mesenchyme interaction [32] such as tubulogenesis [36]. In particular, it seems to be involved in smooth muscle differentiation process [32] and could therefore give an explanation to the Müllerian duct differentiation arrest observed in MRKH syndrome. We are currently investigating more MRKH patients with no visible chromosomal anomaly in search of cryptic 4qter deletions including the *FAT* gene or of mutations within this gene.

### Acknowledgements

The authors are members of the PRAM (Programme de Recherches sur les Aplasies Müllériennes) French national network which is registered in the Orphanet database (<http://orphanet.infobiogen.fr>). We first wish to thank Dr. Laure Camborieux, President of the MAIA association (<http://www.maia-asso.org>) as well as the MRKH patients who are members of this association and who participate in our research program. We are indebted to Céline Hamon and to Stéphane Dréano for their technical help. This work was supported by the CNRS and by grants from Rennes Métropole, Conseil Régional de Bretagne, and La Fondation Langlois. DG is a staff member of the Institut National de la Recherche Médicale (INSERM).

## References

- [1] A.E. Lin, K.L. Garver, G. Diggans, M. Clemens, S.L. Wenger, M.W. Steele, M.C. Jones, J. Israel, Interstitial and terminal deletions of the long arm of chromosome 4: further delineation of phenotypes, *Am. J. Med. Genet.* 31 (1988) 533–548.
- [2] L.J. Evers, C.T. Schrander-Stumpel, J.J. Engelen, H. Mulder, M. Borghgraef, J.P. Fryns, Terminal deletion of long arm of chromosome 4: patient report and literature review, *Genet. Couns.* 4 (1993) 139–145.
- [3] P. Grammatico, L. Spaccini, C. Di Rosa, F. Cupilari, G. Del Porto, Del(4)(pter → q33:) case report and review of the literature, *Genet. Couns.* 8 (1997) 39–42.
- [4] E.M. Strehle, H.M. Bantock, The phenotype of patients with 4q-syndrome, *Genet. Couns.* 14 (2003) 195–205.
- [5] S.P. Robertson, K. O'Day, A. Bankier, The 4q-syndrome: delineation of the minimal critical region to within band 4q31, *Clin. Genet.* 53 (1998) 70–73.
- [6] C.H. Tsai, D.L. Van Dyke, G.L. Feldman, Child with velocardiofacial syndrome and del (4)(q34.2): another critical region associated with a velocardiofacial syndrome-like phenotype, *Am. J. Med. Genet.* 82 (1999) 336–339.
- [7] S.L. Keeling, L. Lee-Jones, P. Thompson, Interstitial deletion 4q32–34 with ulnar deficiency: 4q33 may be the critical region in 4q terminal deletion syndrome, *Am. J. Med. Genet.* 99 (2001) 94–98.
- [8] A. Caliebe, S. Waltz, J. Jenderny, Mild phenotypic manifestations of terminal deletion of the long arm of chromosome 4: clinical description of a new patient, *Clin. Genet.* 52 (1997) 116–119.
- [9] D. Guerrier, T. Mouchel, L. Pasquier, I. Pellerin, The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome (congenital absence of uterus and vagina)—phenotypic manifestations and genetic approaches, *J. Negat. Results Biomed.* 5 (2006) 1.
- [10] S.A. Carson, J.L. Simpson, L.R. Malinak, S. Elias, A.B. Gerbie, V.C. Buttram Jr., G.E. Sarto, Heritable aspects of uterine anomalies. II. Genetic analysis of Mullerian aplasia, *Fertil. Steril* 40 (1983) 86–90.
- [11] L.S. Timmreck, M.R. Gray, B. Handelin, B. Allito, E. Rohlf, A.J. Davis, G. Gidwani, R.H. Reindollar, Analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in patients with congenital absence of the uterus and vagina, *Am J Med Genet A* 120 (2003) 72–76.
- [12] J.E. Griffin, C. Edwards, J.D. Madden, M.J. Harrod, J.D. Wilson, Congenital absence of the vagina. The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome, *Ann. Intern. Med.* 85 (1976) 224–236.
- [13] R.E. Varner, J.B. Younger, R.E. Blackwell, Mullerian dysgenesis, *J. Reprod. Med.* 30 (1985) 443–450.
- [14] M. Folch, I. Pigem, J.C. Konje, Mullerian agenesis: etiology, diagnosis, and management, *Obstet. Gynecol. Surv.* 55 (2000) 644–649.
- [15] E.H. Strubbe, W.N. Willemsen, J.A. Lemmens, C.J. Thijn, R. Rolland, Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: distinction between two forms based on excretory urographic, sonographic, and laparoscopic findings, *AJR Am. J. Roentgenol.* 160 (1993) 331–334.
- [16] E.H. Strubbe, C.W. Cremers, W.N. Willemsen, R. Rolland, C.J. Thijn, The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome without and with associated features: two separate entities? *Clin. Dysmorphol.* 3 (1994) 192–199.
- [17] P.A. Duncan, L.R. Shapiro, J.J. Stangel, R.M. Klein, J.C. Addonizio, The MURCS association: Mullerian duct aplasia, renal aplasia, and cervicothoracic somite dysplasia, *J. Pediatr* 95 (1979) 399–402.
- [18] C. Braun-Quentin, C. Billes, B. Bowing, D. Kotzot, MURCS association: case report and review, *J. Med. Genet.* 33 (1996) 618–620.
- [19] J.P. Schouten, C.J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwijnenburg, F. Diepvens, G. Pals, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) e57.
- [20] C. Dehainault, A. Lauge, V. Caux-Moncoutier, S. Pages-Berhouet, F. Doz, L. Desjardins, J. Couturier, M. Gauthier-Villars, D. Stoppa-Lyonnet, C. Houdayer, Multiplex PCR/liquid chromatography assay for detection of gene rearrangements: application to RB1 gene, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) e139.
- [21] P.L. Townes, M. White, S.V. Di Marzo, 4q-syndrome, *Am. J. Dis. Child* 133 (1979) 383–385.
- [22] T. Huang, A.E. Lin, G.F. Cox, W.L. Golden, G.L. Feldman, M. Ute, C. Schrander-Stumpel, M. Kamisago, S.J. Vermeulen, Cardiac phenotypes in chromosome 4q-syndrome with and without a deletion of the dHAND gene, *Genet. Med.* 4 (2002) 464–467.
- [23] D. Srivastava, T. Thomas, Q. Lin, M.L. Kirby, D. Brown, E.N. Olson, Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND, *Nat. Genet.* 16 (1997) 154–160.
- [24] M.M. Inal, M. Hanhan, B.P. Ilanci, S. Tinar, Fallopian tube malignancies: experience of Social Security Agency Aegean Maternity Hospital, *Int. J. Gynecol. Cancer* 14 (2004) 595–599.



- [25] K.A. Rosenblatt, N.S. Weiss, S.M. Schwartz, Incidence of malignant fallopian tube tumors, *Gynecol. Oncol.* 35 (1989) 236–239.
- [26] J.C. Schink, J.R. Lurain, Rare gynecologic malignancies, *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 3 (1991) 78–90.
- [27] M.F. Acikalin, S. Ozalp, O.T. Yalcin, B. Peker, Mixed serous and endometrioid carcinoma of the fallopian tube: a case report with literature review, *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 26 (2005) 342–344.
- [28] C. Backsch, B. Rudolph, R. Kuhne-Heid, V. Kalscheuer, O. Bartsch, L. Jansen, K. Beer, B. Meyer, A. Schneider, M. Durst, A region on human chromosome 4 (q35.1 → qter) induces senescence in cell hybrids and is involved in cervical carcinogenesis, *Genes Chromosomes Cancer* 43 (2005) 260–272.
- [29] E.S. Cho, J. Chang, K.Y. Chung, D.H. Shin, Y.S. Kim, S.K. Kim, Identification of tumor suppressor loci on the long arm of chromosome 4 in primary small cell lung cancers, *Yonsei Med. J.* 43 (2002) 145–151.
- [30] A. Dellas, J. Torhorst, R. Gaudenz, M.J. Mihatsch, H. Moch, DNA copy number changes in cervical adenocarcinoma, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 2985–2991.
- [31] M.A. Fitzpatrick, M.C. Funk, D. Gius, P.C. Huettner, Z. Zhang, M. Bidder, D. Ma, M.A. Powell, J.S. Rader, Identification of chromosomal alterations important in the development of cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma using alignment of DNA microarray data, *Gynecol. Oncol.* 103 (2006) 458–462.
- [32] J. Dunne, A.M. Hanby, R. Poulson, T.A. Jones, D. Sheer, W.G. Chin, S.M. Da, Q. Zhao, P.C. Beverley, M.J. Owen, Molecular cloning and tissue expression of FAT, the human homologue of the *Drosophila* fat gene that is located on chromosome 4q34–q35 and encodes a putative adhesion molecule, *Genomics* 30 (1995) 207–223.
- [33] P.A. Duncan, L.R. Shapiro, R.M. Klein, The MURCS association, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156 (1987) 1554.
- [34] M.J. Moeller, A. Soofi, G.S. Braun, X. Li, C. Watzl, W. Kriz, L.B. Holzman, Protocadherin FAT1 binds Ena/VASP proteins and is necessary for actin dynamics and cell polarization, *Embo J.* 23 (2004) 3769–3779.
- [35] T. Tanoue, M. Takeichi, New insights into Fat cadherins, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 2347–2353.
- [36] C. Castillejo-Lopez, W.M. Arias, S. Baumgartner, The fat-like gene of *Drosophila* is the true orthologue of vertebrate fat cadherins and is involved in the formation of tubular organs, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 24034–24043.

La caractérisation de cette délétion de 8 Mb de la région 4q34-qter chez une mère et sa fille présentant deux phénotypes très dissemblables soulève avant tout la question de la pathogénicité effective de cette altération génique. En effet, de nombreuses études rapportent l'existence dans le génome humain de variations du nombre de copies de régions génomiques sans manifestation phénotypique pathologique particulière, les plus longs polymorphismes de grande taille n'excédant pas en général 2 Mb (Feuk *et al.*, 2006). Outre le fait que le phénotype de la mère est cohérent avec des cas précédemment publiés de patients présentant des délétions terminales du bras long du chromosome 4, la recherche d'éventuels polymorphismes génétiques de grande taille sur une population de 100 sujets sains n'a révélé aucun événement délétionnel au sein de cette même région (voir chapitre suivant), renforçant notre hypothèse d'une délétion pathogénique. L'identification de cette délétion chromosomique héritée maternellement illustre bien l'expressivité extrêmement variable des désordres génétiques associés à la manifestation du syndrome MRKH, un caractère rendant les corrélations génotype-phénotype difficiles à établir.

La poursuite de notre étude par MLPA ciblant les régions critiques du DGS sur notre cohorte de patientes MRKH conforte notre hypothèse initialement émise selon laquelle il existe une relation entre le syndrome MRKH et le DGS. En effet, en plus de la microdélétion télomérique de la région 4q34-qter déjà décrite, des microdélétions chromosomiques des régions 8p23.1, 10p14-15.1 et 22q11.21 ont également été identifiées dans notre laboratoire chez trois individus non apparentés. Le chapitre qui suit correspond à la publication de ces résultats.

## 2) Mise en évidence, au sein d'une cohorte de patientes MRKH, de microdélétions affectant les régions les plus communément associées au DGS

Cet article, qui rend compte de trois autres microdélétions identifiées au sein des régions dont l'hémizygotie est associée aux manifestations phénotypiques du DGS, est en réécriture avant re-soumission dans « American Journal of Medical Genetics: Part A ».

Tanguy Watrin\*, Karine Morcel\*, Laurent Pasquier, Lucie Rochard, Roman Rouzier, Thomas Mouchel, Cédric Lecaigec, Christèle Dubourg, Philippe Loget, Bernard-Jean Paniel, Sylvie Odent, Jean Levêque, Véronique David, Isabelle Pellerin, Claude Bendavid and Daniel Guerrier. Utero-vaginal aplasia (MRKH syndrome) associated with deletions in the four main Digeorge critical chromosomal regions. \*, co-auteur.



**Utero-vaginal aplasia (MRKH syndrome) associated with deletions in the four main DiGeorge critical chromosomal regions.**

Journal:	<i>American Journal of Medical Genetics: Part A</i>
Manuscript ID:	09-0518
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	26-Jun-2009
Complete List of Authors:	<p>WATRIN, Tanguy; CNRS, UMR 6061  MORCEL, Karine; CNRS, UMR 6061; Rennes University Hospital, Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine  PASQUIER, Laurent; CNRS, UMR 6061; Rennes University Hospital, Clinical Genetics  ROUZIER, Roman; Tenon Hospital, Obstetrics and Gynecology  MOUCHEL, Thomas; Clinique du Tertre Rouge  LECAIGNEC, Cédric; Biology Institute, Medical Genetics  Dubourg, Christèle; CNRS, UMR 6061; Rennes University Hospital, Laboratory of Molecular Genetics  LOGET, Philippe; Rennes University Hospital, Department of Pathology  PANIEL, Bernard-Jean; Creteil Intercity Hospital Center, Gynecology and Obstetrics  Odent, Sylvie; CNRS, UMR 6061; Rennes University Hospital, Clinical Genetics  LEVEQUE, Jean; Rennes University Hospital, Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine  DAVID, Veronique; CNRS, UMR 6061; Rennes University Hospital, Laboratory of Molecular Genetics  PELLERIN, Isabelle; CNRS, UMR 6061  BENDAVID, Claude; CNRS, UMR 6061; Rennes University Hospital, Laboratory of Molecular Genetics  GUERRIER, Daniel; CNRS, UMR 6061</p>
Keywords:	MRKH, Müllerian aplasia, DiGeorge/velocardiafacial syndrome, HRA, ITIH5

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



For Peer Review

Utero-vaginal Aplasia (MRKH syndrome) Associated with Deletions in the Four  
main DiGeorge Critical Chromosomal Regions.

Tanguy Watrin<sup>1,\*</sup>, Karine Morcel<sup>1,2,\*</sup>, Laurent Pasquier<sup>1,3</sup>, Roman Rouzier<sup>4</sup>, Thomas  
Mouchel<sup>5</sup>, Cédric Lecaigec<sup>6</sup>, Christèle Dubourg<sup>1,7</sup>, Philippe Loget<sup>8</sup>, Bernard-Jean Paniel<sup>9</sup>,  
Sylvie Odent<sup>1,3</sup>, Jean Levêque<sup>2</sup>, Véronique David<sup>1,7</sup>, Isabelle Pellerin<sup>1</sup>, Claude Bendavid<sup>1,7</sup>  
and Daniel Guerrier<sup>1§</sup>.

From:

<sup>1</sup> CNRS UMR 6061, Institut de Génétique et Développement de Rennes, IFR 140 GFAS,  
Faculté de Médecine, 2 avenue du Professeur Léon Bernard CS 34317, 35043 Rennes  
Cedex, France.

<sup>2</sup> Département d'Obstétrique, Gynécologie et Médecine de la Reproduction, Hôpital Anne de  
Bretagne, Rennes, France.

<sup>3</sup> Service de Génétique Médicale, "Centre de référence Maladies Rares Anomalies du  
Développement de l'Ouest", Hôpital Anne de Bretagne, Rennes, France.

<sup>4</sup> Service de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Tenon, Assistance Publique des Hôpitaux de  
Paris, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

<sup>5</sup> Clinique du Tertre Rouge, Le Mans, France

<sup>6</sup> Service de Génétique Médicale, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France.

<sup>7</sup> Laboratoire de Génétique Moléculaire et Hormonologie, Pôle Molécules, Centre Hospitalier  
Universitaire de Pontchaillou, Rennes, France.

<sup>8</sup> Service de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire de Pontchaillou, Rennes, France.

<sup>9</sup> Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalier Intercommunal, Créteil, France.

\* Both authors equally contributed to this work

1  
2  
3  
4  
5  
6 **\$ Correspondance to:**  
7

8 Daniel Guerrier, CNRS UMR 6061 CNRS, Institut de Génétique et Développement de  
9  
10 Rennes, IFR 140 GFAS, Faculté de Médecine de Rennes, 2 avenue du Professeur Léon  
11  
12 Bernard CS 34317, 35043 Rennes Cedex, France.  
13

14  
15 TEL: (33)2 23 23 46 79  
16

17 FAX: (33)2.23.23.44.78  
18

19 E-mail: daniel.guerrier@univ-rennes1.fr  
20  
21

22  
23  
24 This study has been approved by the French local Institutional Review Board “Comité de  
25  
26 Protection des Personnes” (Project # 05/16-543) and has been recorded at the French Ministry  
27  
28 of Health (DGS # 2005/030).  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**ABSTRACT**

The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome is characterized by congenital aplasia of the uterus and the upper part of the vagina, in women showing normal development of secondary sexual characteristics and a normal 46, XX karyotype. It often includes associated anomalies, some being part of the malformation spectrum of DiGeorge/velocardiafacial syndrome (DGS/VCFS). This highlights possible genetic link or overlap between both syndromes, which would then have clinical consequence. We thus orientated our analysis in search of chromosomal anomalies similar to those described in patients showing DGS/VCFS phenotypes. We used a Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) approach by mean of a kit designed to investigate the known DGS chromosomal regions. Some deletions were validated and more accurately delineated by PCR/liquid chromatography in a duplex assay.

We found and defined deletions within the four chromosomal 4q34-qter, 8p23.1, 10p14 and 22q11.21 loci which were previously shown to be involved in almost all cases of DG/VCF deletion syndrome. This raises the question whether both MRKH and DG/VCF syndromes can be seen as contiguous gene syndromes or as parts of a wider and heterogeneous deletion syndrome originating from an early embryonic insult and involving common developmental pathways, which would explain the wide range of malformations observed in both syndromes. Clinical investigations and care of patients diagnosed for either of these syndromes should therefore include the overall anomalies featuring both of them.

Key words: Müllerian aplasia, MRKH, DiGeorge/velocardiafacial syndrome, HRA, ITIH5

## INTRODUCTION

Congenital aplasia of the uterus and the upper part (2/3) of the vagina is diagnosed as Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome in 90% of affected women presenting with primary amenorrhea and with otherwise normal secondary sexual characteristics, normal ovaries and normal karyotype (46, XX) [Morcel *et al.* 2007]. The incidence of MRKH syndrome has been estimated as 1 in 4500 female births [Griffin *et al.* 1976; Varner *et al.* 1985; Folch *et al.* 2000]. This condition is subdivided in two forms: MRKH type I (OMIM 277000) where only upper vagina and uterus are absent, and MRKH type II, also called MURCS (Müllerian Renal Cervico-thoracic Somite) association (OMIM 6601076), the most frequent, where additional malformations are optionally observed. They include mainly renal defects (unilateral agenesis or ectopia of one or both kidneys, horseshoe kidney, in about 40–60% of patients) [Strubbe *et al.* 1993], cervicothoracic malformations (asymmetric, fused or wedged vertebrae, scoliosis or Klippel-Feil anomaly, in about 20% of patients) [Strubbe *et al.* 1993]. Less frequent associated anomalies are: hearing defects [Letterie and Vauss 1991; Strubbe *et al.* 1994], cardiac malformations including tetralogy of Fallot [M and Shulman 2002], facial or digital anomalies of varying severities [Chawla *et al.* 1966; Leduc *et al.* 1968; Pinsky 1974; Muechler 1975; Griffin *et al.* 1976; Strubbe *et al.* 1987; Lopez *et al.* 2002]. MRKH type II may be attributed to an alteration of the blastema of the cervicothoracic somites and the pronephric ducts which, by the end of the fourth week of fetal life, have an ultimately spatial relationship [Duncan *et al.* 1979].

Etiology of MRKH syndrome remains poorly understood. In familial cases, the syndrome appears to be transmitted as an autosomal dominant trait with incomplete penetrance and variable expressivity [Griffin *et al.* 1976; Opitz 1987; Pavanello Rde *et al.* 1988; Guerrier *et al.* 2006]. This suggests polygenic or multifactorial causes involving either mutations in one or several major developmental genes, or limited chromosomal imbalances.



1  
2  
3 Lack of clear genetic or chromosomal evidence has led us to consider the wider spectrum of  
4  
5 utero-vaginal aplasia-associated malformations as a start point for genetic investigations, in  
6  
7 comparison with syndromes including some phenotypic features overlapping those of MRKH.  
8  
9 Several anomalies found in a cohort of 55 MRKH syndromic patients and 2 medically aborted  
10  
11 fetuses exhibiting utero-vaginal aplasia, are also included in the range of  
12  
13 DiGeorge/velocardiofacial syndrome, as already pointed out by us [Bendavid *et al.* 2007] and  
14  
15 by others [Devriendt *et al.* 1997; Cheroki *et al.* 2006; Sundaram *et al.* 2007; Cheroki *et al.*  
16  
17 2008; Uliana *et al.* 2008]. In this present large cohort, these anomalies are neck, vertebral and  
18  
19 rib defects, deafness, facial asymmetry, cleft lip/palate, renal adysplasia and heart  
20  
21 malformations.  
22  
23  
24  
25  
26

27 Approximately 90% of DiGeorge syndrome (DGS) patients, 70% of velocardiofacial  
28  
29 syndrome (VCFS) patients, and 15% of patients with sporadic nonsyndromic conotruncal  
30  
31 cardiac defects present with a 1.5 to 3 Mb deletion inside the 22q11.21 chromosomal region  
32  
33 [Thomas and Graham 1997; Cuneo 2001; Yamagishi 2002]. However, DGS/VCFS-like  
34  
35 phenotypes have also been reported in patients with deletions of chromosome 4q34.2-qter  
36  
37 [Tsai *et al.* 1999; Fernandez *et al.* 2008], 8p23-pter [Devriendt *et al.* 1995; Devriendt *et al.*  
38  
39 1999; Fernandez *et al.* 2008], 10p14-p15 [Monaco *et al.* 1991; Schuffenhauer *et al.* 1995;  
40  
41 Daw *et al.* 1996; Van Esch *et al.* 1999; Yatsenko *et al.* 2004; Fernandez *et al.* 2008], 17p13  
42  
43 [Greenberg *et al.* 1988a], 18q21 [Greenberg *et al.* 1988b], and with unbalanced translocations  
44  
45 involving chromosome 22 and other chromosomes [Thomas and Graham 1997; Fernandez *et al.*  
46  
47 2008]. The aforementioned literature clearly shows that, among the uncommon deletions  
48  
49 leading to DGS/VCF-like phenotypes, those involving chromosomes 4, 8 and 10 cited above,  
50  
51 seem to be the most frequent after 22q11.  
52  
53  
54  
55  
56

57 Here we present a deletion analysis of a cohort of 55 living patients and 2 medically  
58  
59 aborted fetuses, all commonly featured by utero-vaginal aplasia evoking MRKH syndrome of  
60

1  
2  
3 varying severity. In addition to MRKH syndrome features already described associated with  
4  
5 4q34-qter [Bendavid et al. 2007] and 22q11 [Devriendt et al. 1997; Le Caignec et al. 2005;  
6  
7 Cheroki et al. 2006; Sundaram et al. 2007; Cheroki et al. 2008; Uliana et al. 2008] deletions,  
8  
9 we found that 8p23 and 10p14-15 deletions can also account for the syndrome. Given that  
10  
11 these four chromosome loci most commonly affected in DGS/VCFS, are also involved in  
12  
13 utero-vaginal aplasia, it is questionable whether these two conditions may be regarded as  
14  
15 contiguous gene syndromes or as varying parts of a wider and heterogeneous deletion  
16  
17 syndrome. This should also have an impact on clinical investigations, the care of the patients  
18  
19 and of their relatives as well as on genetic counseling.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## SUBJECTS AND METHODS

### Patients' ascertainment

We studied 55 women diagnosed for MRKH syndrome, 20 of them presenting with isolated utero-vaginal aplasia and the other 35 variously exhibiting kidney defects, vertebral and other skeletal malformations (including Klippel-Feil and Sprengel anomalies, clinodactyly, brachydactyly, and syndactyly of digits), cardiac anomalies and hearing impairment. All patients had a normal 46, XX karyotype. For most of them, the study included clinical and ultrasonographic examination of the urogenital system, radiographs of the vertebral column as well as heart echography or hearing tests if necessary. Two aborted fetuses were added to this cohort as they showed MRKH-like malformations among other anomalies. This study has been approved by the French local Institutional Review Board "Comité de Protection des Personnes" (Project # 05/16-543) and has been recorded at the French Ministry of Health (DGS # 2005/030).

### Methods

Genomic DNA was prepared from peripheral blood samples or fetal tissues using the QIAamp kit (<http://www.qiagen.com>). We used the SALSA<sup>®</sup> MLPA kit P023-DiGeorge syndrome from MRC-Holland ([www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)), according to the instructions of the manufacturer. This kit allows semi-quantitative analysis of 39 genomic sequences located on chromosome 4 (six targets), 7 (one target), 8 (five targets), 10 (five targets), 17 (four targets), 18 (two targets) and 22 (eleven targets). All experiments were carried out on 100 ng of genomic DNA sample and repeated independently at least twice. Because of the global variation of copy number of DNA sequences in the human genome [Redon *et al.* 2006], we used a group of 100 healthy control subjects (50/50: male/female), representing about twice the size of our cohort of MRKH diagnosed patients.

1  
2  
3 Chromosomal breakpoints were more precisely mapped using multiplex PCR/liquid  
4 chromatography [Dehainault et al. 2004] in a duplex assay. This latter was performed for  
5 deletions affecting chromosome 8 and 10 (cases 3 and 4) and was previously used by us to  
6 delineate the 4q34-qter deletion found in case 1 [Bendavid et al. 2007]. The 22q11.21 deletion  
7 characterized in case 2 was previously detected by mean of CGH array and validated by  
8 QMPSF [Le Caignec et al. 2005].  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

## RESULTS AND DISCUSSION

This study led to finding of four different chromosomal deletions located at 4q34-qter, 8p23, 10p14 and 22q11.21, associated with MRKH-like phenotypes in four independent patients (Table I).

### Relevance to CNVs

The possibility of large scale copy number variations (CNV) had first to be compared with the new candidate loci identified. Indeed CNVs can be associated with developmental disorders and susceptibility to human disease [Inoue and Lupski 2002] but can also be silent or only contribute to phenotypic diversity in humans [Wong *et al.* 2007]. About 15% of genes in the OMIM morbid map overlap with CNVs [Redon *et al.* 2006] and there are numerous examples of possible relevance to both mendelian and complex diseases. For example, the 22q11.21 breakpoint regions involved in DiGeorge syndrome have been found to be highly polymorphic [Redon *et al.* 2006]. Moreover, CNVs have also been identified within the regions commonly deleted in DiGeorge, Smith–Magenis, Williams–Beuren, Prader–Willi and Angelman syndromes [Redon *et al.* 2006]. Probands can thus inherit the disease-associated rearrangements from unaffected parents, which underscores the variable penetrance of some diseases resulting from dosage effects [Redon *et al.* 2006]. One hundred DNA samples from healthy volunteers (about twice the size of the present cohort) were tested with the same MLPA kit and did not show any variation of copy number of the markers used in this kit, thus reinforcing that the four deletions found were likely to be pathogenic.

### Case 1 (4q34-qter deletion).

This patient presented with primary amenorrhea leading to the diagnosis of congenital absence of upper vagina and uterus with normal bilateral adnexa confirmed by laparoscopy. She had normal development thelarche and pubarche. She has neither visceral malformations

1  
2  
3 (in particular heart or kidney as screened by ultrasound exam) nor deafness. No skeletal  
4  
5 anomaly such as scoliosis, Klippel-Feil syndrome, and limb or digit malformation was  
6  
7 noticed. She is about 165 cm tall. Her schooling was standard. She is the single daughter of  
8  
9 non consanguineous parents with one miscarriage. Her father has no medical background. Her  
10  
11 mother is 152 cm tall and now 58 years old. At birth, she had bilateral clubfeet. Later, an  
12  
13 atrial septal defect (ostium secundum type) was detected which needed surgical cure at 23.  
14  
15 Bilateral serous carcinoma of the Fallopian tubes was diagnosed four years ago. She has  
16  
17 neither renal defect nor clinical signs of skeletal anomaly. No mental impairment or others  
18  
19 visceral malformations were reported in this family.  
20  
21  
22  
23

24  
25 An 8 Mb 4q34-qter deletion was found in this woman affected by an isolated utero-  
26  
27 vaginal aplasia (Figure 1). Surprisingly this deletion was inherited from her mother who  
28  
29 presented with an atrial septal defect (ASD) but without any other anomalies commonly  
30  
31 found associated with MRKH [Bendavid *et al.* 2007]. Small terminal deletions of the segment  
32  
33 4q34.2 to 4qter may lead to phenotypic manifestations similar to velocardiofacial syndrome,  
34  
35 including congenital heart defects, cleft palate and learning difficulties [Tsai *et al.* 1999].  
36  
37 Congenital cardiac defects have been described in association with a terminal deletion of the  
38  
39 long arm of chromosome 4 [Lin *et al.* 1988; Tsai *et al.* 1999], and might be related to  
40  
41 haploinsufficiency for *dHAND* [Huang *et al.* 2002], a gene encoding a basic helix-loop-helix  
42  
43 transcription factor expressed in the developing heart [Srivastava *et al.* 1997]. However, since  
44  
45 the mother in the present report had an ASD but *dHAND* was not included in the 4q34-qter  
46  
47 deletion, this gene does not seem to be the only explanation for the cardiac defects. Among  
48  
49 numerous genes included in the deleted region, *FAT* was seen as a candidate gene since it  
50  
51 encodes a regulatory protein involved in smooth muscle differentiation and could account for  
52  
53 malformations observed in both daughter and mother [Bendavid *et al.* 2007]. The description  
54  
55 of an isolated MRKH-like phenotype associated with a 4q34-qter deletion is a unique case, so  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 far. However, it should be added to the wide range of anomalies associated with this terminal  
4  
5 deletion and lead to reconsider the consequent phenotypic variability [Caliebe *et al.* 1997;  
6  
7 Tsai *et al.* 1999].  
8  
9

### 10 11 12 **Case 2 (8p23.1 deletion)** 13

14  
15 This 19 years old female patient was referred for evaluation of primary amenorrhea.  
16  
17 Thelarche and adrenarche had occurred at 13 years of age. Congenital utero-vaginal aplasia  
18  
19 with symmetric muscular buds was established by cœlioscopy. Both ovaries and Fallopian  
20  
21 tubes were normal. Screening of anomalies commonly associated with MRKH syndrome  
22  
23 revealed a unilateral kidney agenesis but no other defects such as deafness or skeletal, heart,  
24  
25 limb and craniofacial malformations. In addition, no psychiatric disorder was detected. She  
26  
27 has two sisters and two brothers, none of them showing any malformation. Her parents were  
28  
29 phenotypically normal but could not be further investigated. There was no family history of  
30  
31 recurrent abortion or consanguinity.  
32  
33  
34  
35

36  
37 Small interstitial deletions of 8p23.1 have been associated with severe congenital heart  
38  
39 disease (CHD) such as atrioventricular canal, atrial septal and ventricular septal defects,  
40  
41 mental retardation, microcephaly, and a characteristic behavioral phenotype, and have been  
42  
43 assigned as another DGS/VCF-like locus [Devriendt *et al.* 1995; Devriendt *et al.* 1999]. In all  
44  
45 cases where CHD was described, the *GATA4* gene was involved [Devriendt *et al.* 1999;  
46  
47 Pehlivan *et al.* 1999]; on the other hand, this gene was not deleted in patients without heart  
48  
49 defect [Devriendt *et al.* 1999]. The deleted region we found in this patient is close to *GATA4*  
50  
51 but does not include this gene, which is consistent with her phenotypic description. This  
52  
53 region includes the peptide methionine sulfoxide reductase (*MSRA*) gene [Moskovitz *et al.*  
54  
55 1996], the retina-specific *RP1L1* gene [Bowne *et al.* 2003], a micro-RNA preferentially  
56  
57 expressed in the brain [Visvanathan *et al.* 2007], and the *TNKS* gene involved in the  
58  
59  
60

1  
2  
3 regulation of telomere length [Smith et al. 1998]; none of these genes being likely involved in  
4  
5 MRKH syndrome. However, description of genitourinary anomalies and other malformations  
6  
7 included in the MURCS association (MRKH type II) such as tetralogy of Fallot, polydactyly,  
8  
9 scoliosis and other vertebral abnormalities [Hutchinson et al. 1992; Pehlivan et al. 1999;  
10  
11 Reddy 1999], suggest that a small region, adjacent to the DGS/VCFS locus, may be involved  
12  
13 in utero-vaginal aplasia and other associated malformations. Other genes of unknown function  
14  
15 locate in this region. Analysis of further patients showing MRKH/MURCS phenotypes will  
16  
17 certainly help to better define this region and therefore to delineate candidate genes. Finally,  
18  
19 this entire region seems to be not subject to any CNV or segmental duplication as described in  
20  
21 the Database of Genomic Variants. This strengthens the present finding and description of a  
22  
23 small chromosomal 1.6 Mb sequence responsible for MRKH phenotype associated or not  
24  
25 with DiGeorge anomalies.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

### 34 **Case 3 (10p14-15.1 deletion)**

35  
36 The history of this family begun when unilateral renal agenesis was discovered by  
37  
38 echography in a female fetus during a first pregnancy. After birth, utero-vaginal condition  
39  
40 was not accessible due to young age and is still not. The second pregnancy was terminated at  
41  
42 18 weeks of gestation because of bilateral renal agenesis. Fetopathological examination  
43  
44 confirmed the renal malformation associated with absence of the bladder and showed  
45  
46 additional utero-vaginal and Fallopian tubes aplasia. No other skeletal or heart malformation  
47  
48 was noticed. We later established that the father had unilateral renal agenesis as well as one of  
49  
50 his first degree female cousins who additionally showed associated homolateral half-uterus.  
51  
52 During a third pregnancy, a unilateral renal agenesis was discovered in a female fetus. The  
53  
54 child was recently liveborn and is still in good health. Further examination is not possible yet  
55  
56 due to young age. This family history (Figure 2) appears to be consistent with diagnosis of  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 dominant hereditary renal adysplasia (HRA) as already suggested in similar family histories  
4  
5 [Opitz 1987; Battin *et al.* 1993].  
6  
7

8 Patients with partial monosomy 10p often show symptoms of the DGS/VCFS  
9  
10 spectrum [Daw *et al.* 1996; Van Esch *et al.* 1999]. The phenotype seems to be the result of  
11  
12 haploinsufficiency of two adjacent regions on 10p, the HDR1 region associated with  
13  
14 hypoparathyroidism, sensorineural deafness, and renal defects (HDR syndrome) and the more  
15  
16 proximal region DGCR2 responsible for heart defects and thymus hypoplasia/aplasia,  
17  
18 meaning that the DGS-like phenotype associated with partial monosomy 10p is a contiguous  
19  
20 gene syndrome [Lichtner *et al.* 2000]. *GATA3* was identified as the disease causing gene for  
21  
22 HDR syndrome [Van Esch *et al.* 2000] and *BRUNOL3*, one of the only gene locating within  
23  
24 the DGCR2 region, has been hypothesized to be responsible for thymus hypoplasia and  
25  
26 possibly for heart defect [Lichtner *et al.* 2002]. In the present case, we have identified a small  
27  
28 (0.9 Mb) deletion which seems to only affect the *ITIH5* gene, locating within the HDR locus,  
29  
30 in between the undeleted *SFMBT2* and *GATA3* genes (Figure 1). We are currently restricting  
31  
32 this deletion by mean of multiplex semi-quantitative PCR/liquid chromatography and have  
33  
34 already shown that only a part of the 110 kb *ITIH5* gene is deleted (results not shown). These  
35  
36 results seem to demonstrate that, despite of the undisputable involvement of *GATA3* in HDR  
37  
38 syndrome [Van Esch *et al.* 2000], another gene within the same locus, *ITIH5*, may also  
39  
40 account for kidney malformation and, in addition, for genital anomalies. Indeed, in a familial  
41  
42 case very similar to the present one (Figure 2), a woman with unilateral renal agenesis gave  
43  
44 birth to 2 children with the same condition and a third child with bilateral renal agenesis  
45  
46 [Buchta *et al.* 1973]. Another female family member lacked a left kidney and Fallopian tube  
47  
48 and had a uterus bicornis with normal right Fallopian tube. The elder of 2 daughters with  
49  
50 unilateral renal aplasia had primary amenorrhea due to utero-vaginal aplasia with absent  
51  
52 Fallopian tubes [Opitz 1987], suggesting a relationship between renal adysplasia and MRKH  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 syndrome [Buchta et al. 1973; Opitz 1987] and that developmental defects in the mesonephric  
4  
5 and paramesonephric ducts may have a common genetic basis [Schimke and King 1980].  
6  
7 Therefore, the designation "hereditary urogenital adysplasia" for the combination of  
8  
9 anomalies of the Müllerian duct with developmental errors of the urinary tract might be more  
10  
11 appropriate [Schimke and King 1980]. Finally, the report of a family with unilateral or  
12  
13 bilateral renal agenesis in combination with MRKH-like Müllerian anomalies, provided  
14  
15 support for an autosomal dominant pattern of inheritance with incomplete penetrance and  
16  
17 variable expressivity in hereditary renal adysplasia associated with Müllerian defects [Battin  
18  
19 et al. 1993].  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26

#### 27 **Case 4 (22q11.21 deletion)**

28  
29 This case is a female fetus resulting from a terminated pregnancy at 23 weeks of  
30  
31 gestation because of bilateral renal agenesis. Fetopathological examination showed, in  
32  
33 addition, a type B interrupted aortic arch, thymic hypoplasia, agenesis of the uterus, oviducts  
34  
35 and proximal part of the vagina. Deletion of three clustered probes located at 22q11.2 was  
36  
37 detected by CGH array, confirmed by mean of QMPSF and visualized by FISH in an initial  
38  
39 study and was considered a *de novo* mutation [Le Caignec et al. 2005]. Here we used an  
40  
41 MLPA approach that corroborated these findings (Figure 3A). To our knowledge, bilateral  
42  
43 renal agenesis identified in this fetus has never been reported associated with a 22q11.21  
44  
45 deletion. Agenesis of uterus, oviducts and proximal part of the vagina associated with  
46  
47 unilateral renal agenesis and contralateral multicystic renal dysplasia was described once in a  
48  
49 female fetus presenting a Potter sequence [Devriendt et al. 1997]. Recently several cases of  
50  
51 utero-vaginal aplasia associated with unilateral renal agenesis and other manifestations of  
52  
53 22q11.21 deletion syndrome, were reported in adults [Sundaram et al. 2007; Cheroki et al.  
54  
55 2008; Uliana et al. 2008], tending to show that unilateral or bilateral renal agenesis are more  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 or less severe manifestations of a similar embryonic insult that may also influence Müllerian  
4 derivatives development. Indeed, renal malformations appear to be frequently (36%)  
5  
6 derivatives development. Indeed, renal malformations appear to be frequently (36%)  
7  
8 associated with 22q11.21 deletion [Ryan et al. 1997] whereas utero-vaginal aplasia remains  
9  
10 quite rare. The description of a patient presenting a 22q11.21 deletion with associated  
11  
12 Müllerian anomalies but no renal affection [Cheroki et al. 2006], seems then to be an  
13  
14 exception. Interestingly, this latter patient shows a deletion identical to that of the present case  
15  
16 4 (Figure 3B and 3C). This shows that kidney and Müllerian derivatives, which are  
17  
18 embryonically related, can be equally affected by 22q11.21 deletions, with a higher  
19  
20 prevalence for isolated kidney adysplasia [Wilson et al. 1993; Ryan et al. 1997; Shaikh et al.  
21  
22 2000]. Among 22q11.21 overlapping deletions associated with utero-vaginal aplasia  $\pm$  renal  
23  
24 malformations (Figure 3C), it is noteworthy that the smallest common deleted region  
25  
26 corresponds to the ~3Mb most common 22q11.21 deletion associated with DGS/VCFS  
27  
28 [Shaikh et al. 2000]. This strongly suggests that utero-vaginal aplasia is a component of the  
29  
30 22q11.21 malformation spectrum which therefore appears even more variable and continues  
31  
32 to expand as previously suggested [Sundaram et al. 2007; Cheroki et al. 2008; Uliana et al.  
33  
34 2008]. This is reinforced by the observation of skeletal malformations commonly found in  
35  
36 22q11.21 deletion syndrome [Uliana et al. 2008] and in MRKH syndrome [Morcel et al.  
37  
38 2007].

39  
40  
41 The pathogenesis of DGS/VCFS remains partly unsolved. It may at least be related to  
42  
43 an abnormal neural crest-derived cell development and function during early embryogenesis  
44  
45 [Budarf and Emanuel 1997]. Pathogenesis of utero-vaginal aplasia, associated or not with  
46  
47 other malformations is even more unclear since genetic events triggering this pathology are  
48  
49 still quite unknown. However it may be attributed as the result of a non-random embryonic  
50  
51 insult by the end of the fourth weeks of gestation, when the blastemas of the pronephric buds  
52  
53 and cervicothoracic somite buds are in close relation [Duncan et al. 1979]. The anomalies  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 observed in both disorders, when associated with a 22q11.21 deletion, can thus be thought of  
4  
5 as deriving from a common early defect or disruption in fetal mesoderm or its progenitor  
6  
7 tissue at the time of primitive streak formation, giving rise to a wide and heterogeneous  
8  
9 malformation spectrum.  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

## CONCLUSION

The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome consists in aplasia of Müllerian derivatives, as the result of an early embryonic insult. Extra-genital anomalies, such as urinary tract, skeletal and heart malformations, are diversely observed in MRKH patients and are part of the DGS/VCFS phenotypic spectrum; this was the start point of the present genetic investigations. The finding of utero-vaginal aplasia associated with chromosomal 4q34-qter, 8p23, 10p14-15 and 22q11.21 deletions initially described as a cause of DGS/VCFS is somewhat not surprising and strongly suggests that Müllerian aplasia is an additional feature of the broad spectrum of DiGeorge/velocardiafacial deletion syndrome. This implies that amongst numerous genes included in the above deletions, some play major and pleiotropic roles during early development whilst others have more restricted roles on specific organ development, such as *GATA3* on 10p15, involved in heart, kidney and hearing malformations [Van Esch *et al.* 2000] or *dHAND* on 4q34 [Huang *et al.* 2002] and *GATA4* on 8p23 [Pehlivan *et al.* 1999], both being only implicated in heart defects. In other terms, this could explain why there is no possible correlation between the length of the deletion and severity of the disease in the 22q21.1 deletion syndrome, as suggested by Uliana *et al.* [Uliana *et al.* 2008], this chromosomal segment containing at least one "pleiotropic" gene, the haploinsufficiency of which causing malformation of several organs. Conversely, utero-vaginal aplasia would be caused by deletion of gene(s) flanking typical DGS/VCFS regions such as 4q34 previously described by us [Bendavid *et al.* 2007] and in the present study, as well as 8p23 and 10p14-p15 reported here. In these three latter cases, utero-vaginal aplasia with features of DGS/VCF could thus be considered as a contiguous gene syndrome. This should lead clinicians to reconsider not only the differential diagnosis of utero-vaginal aplasia but also to extended phenotype of both MRKH and DG/VCF syndromes. In particular, patients diagnosed for MRKH type II (MURCS association) and showing evocative features

1  
2  
3 of DGS/VCFS should be evaluated for 22q11.2 deletion genetic test. On the other hand,  
4  
5 patients with 22q11.2 deletion might be further assessed for urogenital anomalies, as well. As  
6  
7 a first attempt, the use of SALSA<sup>®</sup> MLPA kit P023-DiGeorge might present as the most rapid  
8  
9 and effective genetic test for patients showing features of either syndrome since the four  
10  
11 4q34-qter, 8p23, 10p14-15 and 22q11.21 can be tested together. Finally, these new clinical  
12  
13 and genetic data should be considered for genetic counseling since both syndromes show  
14  
15 similar multifactorial/polygenic inheritance.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are members of the PRAM (Programme de Recherches sur les Aplasies Müllériennes) French national network which is registered in the Orphanet database (<http://orphanet.infobiogen.fr>). We first wish to thank members of both MAIA (<http://www.maia-asso.org>) and Syndrome de Rokitansky-MRKH (<http://asso.orpha.net/MRKH>) associations for their contribution, and especially MRKH patients who participated in our research program. We are grateful to Dr. Anne-Marie Jouanolle who provided us with DNA samples from healthy volunteer donors. We are indebted to Céline Hamon and to Stéphane Dréano for their technical help and to Caroline Evain for proofreading of the manuscript. This work was supported by the CNRS and by grants from Rennes Métropole, Conseil Régional de Bretagne, and La Fondation Langlois. D. Guerrier is a staff member of the Institut National de la Recherche Médicale (INSERM).

## ELECTRONIC DATABASE INFORMATION

The URLs for data presented herein are as follow:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

NCBI Map Viewer: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>

HUGO Gene Nomenclature Committee: <http://www.genenames.org/index.html>

Database of Genomic Variants: (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER): (<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/>).

## REFERENCES

- 1  
2  
3  
4  
5  
6 Battin J, Lacombe D, Leng JJ (1993) Familial occurrence of hereditary renal adysplasia with  
7 mullerian anomalies. *Clin Genet* 43:23-4
- 8 Bendavid C, Pasquier L, Watrin T, Morcel K, Lucas J, Gicquel I, Dubourg C, Henry C, David  
9 V, Odent S, Leveque J, Pellerin I, Guerrier D (2007) Phenotypic variability of a 4q34--  
10 >qter inherited deletion: MRKH syndrome in the daughter, cardiac defect and Fallopi-  
11 an tube cancer in the mother. *Eur J Med Genet* 50:66-72
- 12 Bowne SJ, Daiger SP, Malone KA, Heckenlively JR, Kennan A, Humphries P, Hughbanks-  
13 Wheaton D, Birch DG, Liu Q, Pierce EA, Zuo J, Huang Q, Donovan DD, Sullivan LS  
14 (2003) Characterization of RP1L1, a highly polymorphic paralog of the retinitis  
15 pigmentosa 1 (RP1) gene. *Mol Vis* 9:129-37
- 16 Buchtá RM, Viseskul C, Gilbert EF, Sarto GE, Opitz JM (1973) Familial bilateral renal  
17 agenesis and hereditary renal adysplasia. *Z Kinderheilkd* 115:111-29
- 18 Budarf ML, Emanuel BS (1997) Progress in the autosomal segmental aneusomy syndromes  
19 (SASs): single or multi-locus disorders? *Hum Mol Genet* 6:1657-65
- 20 Caliebe A, Waltz S, Jenderny J (1997) Mild phenotypic manifestations of terminal deletion of  
21 the long arm of chromosome 4: clinical description of a new patient. *Clin Genet* 52:116-9
- 22 Chawla S, Bery K, Indra KJ (1966) Abnormalities of urinary tract and skeleton associated  
23 with congenital absence of vagina. *Br Med J* 5500:1398-400
- 24 Cheroki C, Krepischi-Santos AC, Rosenberg C, Jehee FS, Mingroni-Netto RC, Pavanello  
25 Filho I, Zanforlin Filho S, Kim CA, Bagnoli VR, Mendonca BB, Szuhai K, Otto PA  
26 (2006) Report of a del22q11 in a patient with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hausler (MRKH)  
27 anomaly and exclusion of WNT-4, RAR-gamma, and RXR-alpha as major genes  
28 determining MRKH anomaly in a study of 25 affected women. *Am J Med Genet A*  
29 140:1339-42
- 30 Cheroki C, Krepischi-Santos AC, Szuhai K, Brenner V, Kim CA, Otto PA, Rosenberg C  
31 (2008) Genomic imbalances associated with mullerian aplasia. *J Med Genet* 45:228-32
- 32 Cuneo BF (2001) 22q11.2 deletion syndrome: DiGeorge, velocardiofacial, and conotruncal  
33 anomaly face syndromes. *Curr Opin Pediatr* 13:465-72
- 34 Daw SC, Taylor C, Kraman M, Call K, Mao J, Schuffenhauer S, Meitinger T, Lipson T,  
35 Goodship J, Scambler P (1996) A common region of 10p deleted in DiGeorge and  
36 velocardiofacial syndromes. *Nat Genet* 13:458-60
- 37 Dehainault C, Lauge A, Caux-Moncoutier V, Pages-Berhouet S, Doz F, Desjardins L,  
38 Couturier J, Gauthier-Villars M, Stoppa-Lyonnet D, Houdayer C (2004) Multiplex  
39 PCR/liquid chromatography assay for detection of gene rearrangements: application to  
40 RB1 gene. *Nucleic Acids Res* 32:e139
- 41 Devriendt K, De Mars K, De Cock P, Gewillig M, Fryns JP (1995) Terminal deletion in  
42 chromosome region 8p23.1-8pter in a child with features of velo-cardio-facial syndrome.  
43 *Ann Genet* 38:228-30
- 44 Devriendt K, Matthijs G, Van Dael R, Gewillig M, Eyskens B, Hjalgrim H, Dolmer B,  
45 McGaughan J, Brondum-Nielsen K, Marynen P, Fryns JP, Vermeesch JR (1999)  
46 Delineation of the critical deletion region for congenital heart defects, on chromosome  
47 8p23.1. *Am J Hum Genet* 64:1119-26
- 48 Devriendt K, Moerman P, Van Schoubroeck D, Vandenberghe K, Fryns JP (1997)  
49 Chromosome 22q11 deletion presenting as the Potter sequence. *J Med Genet* 34:423-5
- 50 Duncan PA, Shapiro LR, Stangel JJ, Klein RM, Addonizio JC (1979) The MURCS  
51 association: Mullerian duct aplasia, renal aplasia, and cervicothoracic somite dysplasia. *J*  
52 *Pediatr* 95:399-402
- 53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



- 1  
2  
3 Fernandez L, Lapunzina P, Pajares IL, Palomares M, Martinez I, Fernandez B, Quero J,  
4 Garcia-Guereta L, Garcia-Alix A, Burgueros M, Galan-Gomez E, Carbonell-Perez JM,  
5 Perez-Granero A, Torres-Juan L, Heine-Suner D, Rosell J, Delicado A (2008) Unrelated  
6 chromosomal anomalies found in patients with suspected 22q11.2 deletion. *Am J Med*  
7 *Genet A* 146A:1134-41
- 8  
9 Folch M, Pigem I, Konje JC (2000) Mullerian agenesis: etiology, diagnosis, and management.  
10 *Obstet Gynecol Surv* 55:644-9
- 11  
12 Greenberg F, Courtney KB, Wessels RA, Huhta J, Carpenter RJ, Rich DC, Ledbetter DH  
13 (1988a) Prenatal diagnosis of deletion 17p13 associated with DiGeorge anomaly. *Am J*  
14 *Med Genet* 31:1-4
- 15  
16 Greenberg F, Elder FF, Haffner P, Northrup H, Ledbetter DH (1988b) Cytogenetic findings in  
17 a prospective series of patients with DiGeorge anomaly. *Am J Hum Genet* 43:605-11
- 18  
19 Griffin JE, Edwards C, Madden JD, Harrod MJ, Wilson JD (1976) Congenital absence of the  
20 vagina. The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Ann Intern Med* 85:224-36
- 21  
22 Guerrier D, Mouchel T, Pasquier L, Pellerin I (2006) The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser  
23 syndrome (congenital absence of uterus and vagina)--phenotypic manifestations and  
24 genetic approaches. *J Negat Results Biomed* 5:1
- 25  
26 Huang T, Lin AE, Cox GF, Golden WL, Feldman GL, Ute M, Schrandt-Stumpel C,  
27 Kamisago M, Vermeulen SJ (2002) Cardiac phenotypes in chromosome 4q- syndrome  
28 with and without a deletion of the dHAND gene. *Genet Med* 4:464-7
- 29  
30 Hutchinson R, Wilson M, Voullaire L (1992) Distal 8p deletion (8p23.1----8pter): a common  
31 deletion? *J Med Genet* 29:407-11
- 32  
33 Inoue K, Lupski JR (2002) Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev*  
34 *Genomics Hum Genet* 3:199-242
- 35  
36 Le Caignec C, Boceno M, Saugier-Veber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Frebourg T,  
37 Rival JM (2005) Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic  
38 hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet* 42:121-8
- 39  
40 Leduc B, van Campenhout J, Simard R (1968) Congenital absence of the vagina.  
41 Observations on 25 cases. *Am J Obstet Gynecol* 100:512-20
- 42  
43 Letterie GS, Vauss N (1991) Mullerian tract abnormalities and associated auditory defects. *J*  
44 *Reprod Med* 36:765-8
- 45  
46 Lichtner P, Attie-Bitach T, Schuffenhauer S, Henwood J, Bouvagnet P, Scambler PJ,  
47 Meitinger T, Vekemans M (2002) Expression and mutation analysis of BRUNOL3, a  
48 candidate gene for heart and thymus developmental defects associated with partial  
49 monosomy 10p. *J Mol Med* 80:431-42
- 50  
51 Lichtner P, Konig R, Hasegawa T, Van Esch H, Meitinger T, Schuffenhauer S (2000) An  
52 HDR (hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia) syndrome locus maps distal to the  
53 DiGeorge syndrome region on 10p13/14. *J Med Genet* 37:33-7
- 54  
55 Lin AE, Garver KL, Diggans G, Clemens M, Wenger SL, Steele MW, Jones MC, Israel J  
56 (1988) Interstitial and terminal deletions of the long arm of chromosome 4: further  
57 delineation of phenotypes. *Am J Med Genet* 31:533-48
- 58  
59 Lopez AG, Fryns JP, Devriendt K (2002) MURCS association with duplicated thumb. *Clin*  
60 *Genet* 61:308-9
- M LG, Shulman LP (2002) Tetralogy of Fallot, imperforate anus, and Mullerian, renal, and  
cervical spine (MURCS) anomalies in a 15-year-old girl. *J Pediatr Adolesc Gynecol*  
15:231-3
- Monaco G, Pignata C, Rossi E, Mascellaro O, Cocozza S, Ciccimarra F (1991) DiGeorge  
anomaly associated with 10p deletion. *Am J Med Genet* 39:215-6
- Morcel K, Camborieux L, Guerrier D (2007) Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH)  
syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2:13

- 1  
2  
3 Moskowitz J, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Jursky F, Weissbach H, Brot N (1996)  
4 Chromosomal localization of the mammalian peptide-methionine sulfoxide reductase gene  
5 and its differential expression in various tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3205-8  
6 Muechler EK (1975) Mullerian duct agenesis associated with renal and skeletal abnormalities.  
7 *Am J Obstet Gynecol* 121:567-8  
8  
9 Opitz JM (1987) Vaginal atresia (von Mayer-Rokitansky-Kuster or MRK anomaly) in  
10 hereditary renal adysplasia (HRA). *Am J Med Genet* 26:873-6  
11 Pavanello Rde C, Eigier A, Otto PA (1988) Relationship between Mayer-Rokitansky-Kuster  
12 (MRK) anomaly and hereditary renal adysplasia (HRA). *Am J Med Genet* 29:845-9  
13 Pehlivan T, Pober BR, Brueckner M, Garrett S, Slaugh R, Van Rheeden R, Wilson DB,  
14 Watson MS, Hing AV (1999) GATA4 haploinsufficiency in patients with interstitial  
15 deletion of chromosome region 8p23.1 and congenital heart disease. *Am J Med Genet*  
16 83:201-6  
17  
18 Pinsky L (1974) A community of human malformation syndromes involving the Mullerian  
19 ducts, distal extremities, urinary tract, and ears. *Teratology* 9:65-79  
20 Reddy KS (1999) A paternally inherited terminal deletion, del(8)(p23.1)pat, detected  
21 prenatally in an amniotic fluid sample: a review of deletion 8p23.1 cases. *Prenat Diagn*  
22 19:868-72  
23  
24 Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, et al. (2006)  
25 Global variation in copy number in the human genome *Nature*. Vol. 444, pp 444-54  
26 Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, et al.  
27 (1997) Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11  
28 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* 34:798-804  
29  
30 Schimke RN, King CR (1980) Hereditary urogenital adysplasia. *Clin Genet* 18:417-20  
31 Schuffenhauer S, Seidel H, Oechsler H, Belohradsky B, Bernsau U, Murken J, Meitinger T  
32 (1995) DiGeorge syndrome and partial monosomy 10p: case report and review. *Ann*  
33 *Genet* 38:162-7  
34  
35 Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, Driscoll DA, McDonald-  
36 McGinn DM, Zackai EH, Budarf ML, Emanuel BS (2000) Chromosome 22-specific low  
37 copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion  
38 endpoint analysis. *Hum Mol Genet* 9:489-501  
39  
40 Smith S, Giriat I, Schmitt A, de Lange T (1998) Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase  
41 at human telomeres. *Science* 282:1484-7  
42  
43 Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN (1997) Regulation of cardiac  
44 mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat*  
45 *Genet* 16:154-60  
46  
47 Strubbe EH, Cremers CW, Dikkers FG, Willemsen WN (1994) Hearing loss and the Mayer-  
48 Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Am J Otol* 15:431-6  
49  
50 Strubbe EH, Thijn CJ, Willemsen WN, Lappohn R (1987) Evaluation of radiographic  
51 abnormalities of the hand in patients with the Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser  
52 syndrome. *Skeletal Radiol* 16:227-31  
53  
54 Strubbe EH, Willemsen WN, Lemmens JA, Thijn CJ, Rolland R (1993) Mayer-Rokitansky-  
55 Kuster-Hauser syndrome: distinction between two forms based on excretory urographic,  
56 sonographic, and laparoscopic findings. *Am J Roentgenol* 160:331-4  
57  
58 Sundaram UT, McDonald-McGinn DM, Huff D, Emanuel BS, Zackai EH, Driscoll DA,  
59 Bodurtha J (2007) Primary amenorrhea and absent uterus in the 22q11.2 deletion  
60 syndrome. *Am J Med Genet A*  
Thomas JA, Graham JM, Jr. (1997) Chromosomes 22q11 deletion syndrome: an update and  
review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr (Phila)* 36:253-66

- 1  
2  
3 Tsai CH, Van Dyke DL, Feldman GL (1999) Child with velocardiofacial syndrome and del  
4 (4)(q34.2): another critical region associated with a velocardiofacial syndrome-like  
5 phenotype. *Am J Med Genet* 82:336-9  
6  
7 Uliana V, Giordano N, Caselli R, Papa FT, Ariani F, Marcocci C, Gianetti E, Martini G,  
8 Papakostas P, Rollo F, Meloni I, Mari F, Priolo M, Renieri A, Nuti R (2008) Expanding  
9 the phenotype of 22q11 deletion syndrome: the MURCS association. *Clin Dysmorphol*  
10 17:13-7  
11  
12 Van Esch H, Groenen P, Fryns JP, Van de Ven W, Devriendt K (1999) The phenotypic  
13 spectrum of the 10p deletion syndrome versus the classical DiGeorge syndrome. *Genet*  
14 *Couns* 10:59-65  
15  
16 Van Esch H, Groenen P, Nesbit MA, Schuffenhauer S, Lichtner P, Vanderlinden G, Harding  
17 B, Beetz R, Bilous RW, Holdaway I, Shaw NJ, Fryns JP, Van de Ven W, Thakker RV,  
18 Devriendt K (2000) GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. *Nature*  
19 406:419-22  
20  
21 Varner RE, Younger JB, Blackwell RE (1985) Mullerian dysgenesis. *J Reprod Med* 30:443-  
22 50  
23  
24 Visvanathan J, Lee S, Lee B, Lee JW, Lee SK (2007) The microRNA miR-124 antagonizes  
25 the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev*  
26 21:744-9  
27  
28 Wilson DI, Burn J, Scambler P, Goodship J (1993) DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J*  
29 *Med Genet* 30:852-6  
30  
31 Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, MacAulay C, Ng  
32 RT, Brown CJ, Eichler EE, Lam WL (2007) A comprehensive analysis of common copy-  
33 number variations in the human genome *Am J Hum Genet*. Vol. 80, pp 91-104  
34  
35 Yamagishi H (2002) The 22q11.2 deletion syndrome. *Keio J Med* 51:77-88  
36  
37 Yatsenko SA, Yatsenko AN, Szigeti K, Craigen WJ, Stankiewicz P, Cheung SW, Lupski JR  
38 (2004) Interstitial deletion of 10p and atrial septal defect in DiGeorge 2 syndrome. *Clin*  
39 *Genet* 66:128-36  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**FIGURES LEGEND**

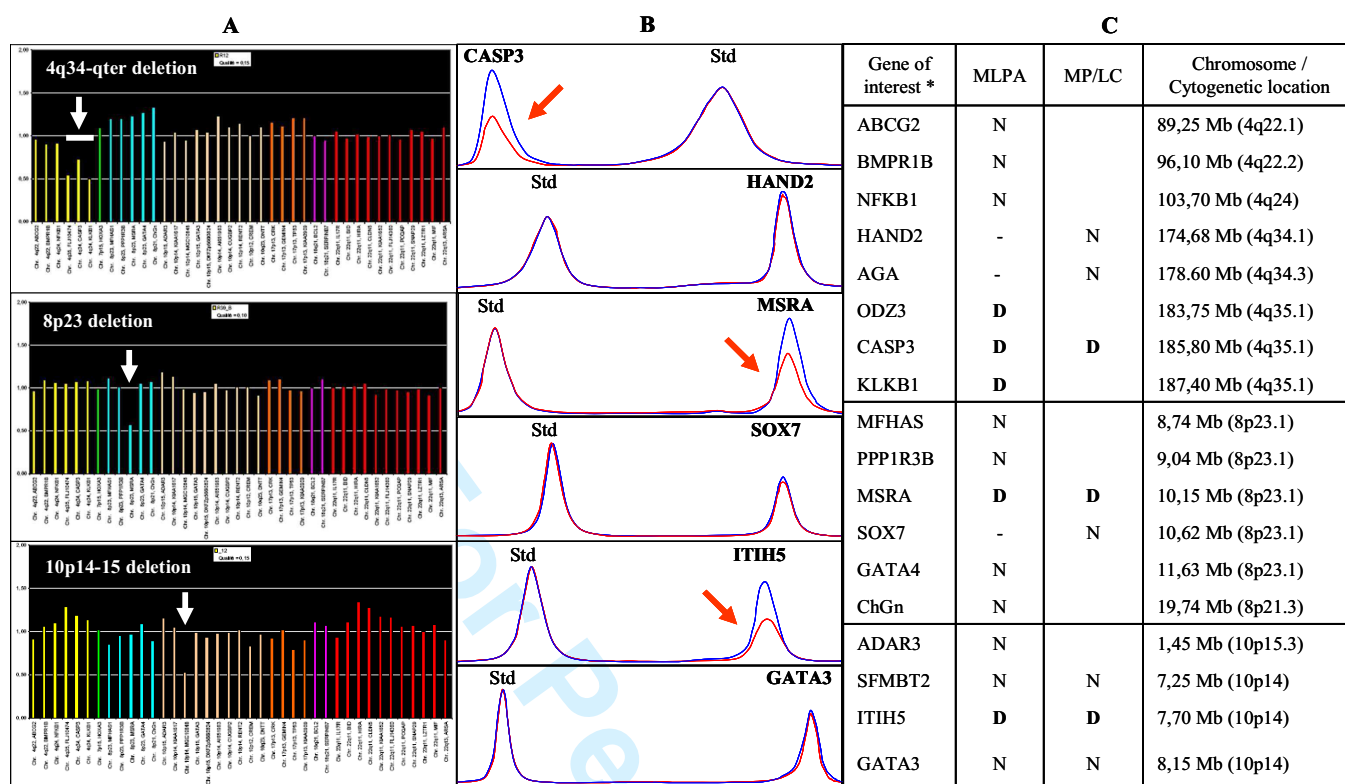
**Figure 1:** Summary of experimental investigations for cases 1, 3 and 4: **(A)** Multiplex Ligation-dependent PCR Amplification (MLPA) condensed results. Histograms represent allelic dosage of each target gene. Colors correspond to chromosomal regions of interest or used as internal control (Yellow: chromosome 4q, green: chromosome 7p15, blue: chromosome 8p, brown: chromosome 10p, orange: chromosome 17p, purple: chromosome 18q and red: chromosome 22q). White arrows show deletions **(B)** Confirmation and/or more accurate delineation by multiplex PCR/liquid chromatography (MP/LC). The hydroxymethylbilane synthase (HMBS) gene, located at 11q23.2-qter, was used as standard. Blue curve = control genomic DNA; red curve = genomic DNA from patient analyzed. Each gene of interest is written in bold above the corresponding curve; Std = standard gene. The red arrow shows allelic loss of the gene of interest. **(C)** Chromosomal and cytogenetic location of targeted genes. \* = gene names according to HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). Each gene of interest is provided together with its status (N = not deleted; **D** = deleted, - = not included in the MLPA kit), and its distance from the telomeric end of the short (p) or long (q) arm of the corresponding chromosome as well as its cytogenetic location according to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Map Viewer software.

**Figure 2:** Pedigree of the family with a female fetus resulting from a terminated pregnancy at 23 weeks gestation because of bilateral renal agenesis (case 2). Question marks indicate that phenotype of putative genetic carriers of the disease, is not known.

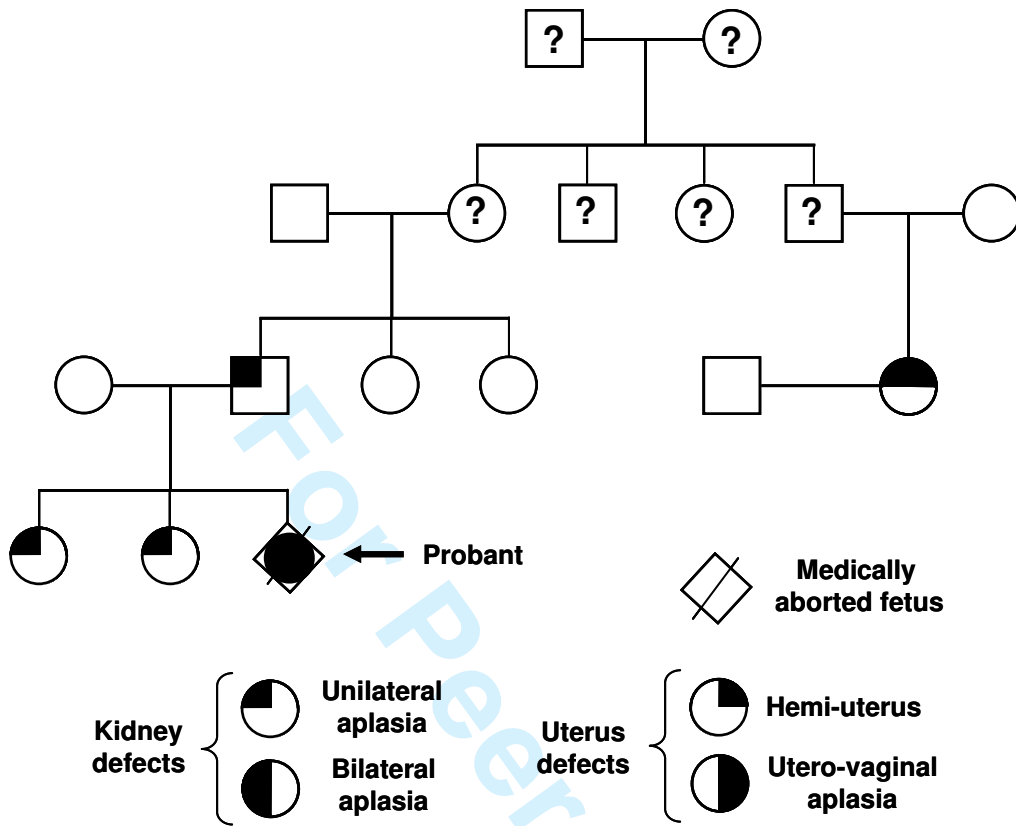
1  
2  
3 **Figure 3:** Summary of present (case 2) and previous mapping of chromosome 22q21.21  
4 deletions found in patients presenting with MRKH phenotypes. (A) Multiplex Ligation-  
5 dependent PCR Amplification (MLPA) condensed results. Histograms represent allelic  
6 dosage of each target gene. Colors correspond to chromosomal regions of interest or used as  
7 internal control (same as figure 2). The white arrow and horizontal bar indicate deleted  
8 markers. (B) Chromosomal and cytogenetic location of each chromosome 22 marker used in  
9 the MLPA experimental approach. Gene used as markers are named according to HUGO  
10 Gene Nomenclature Committee (HGNC); the asterisk indicate that the gene is also mentioned  
11 in part C of this figure. N = not deleted; D = deleted. (C) Schematic representation of the  
12 centromeric side of chromosome 22 long arm, between 15 and 23 Mb from the telomeric end  
13 of the short arm. Genes used as reference and/or as markers in the MLPA kit are indicated.  
14 The location of the Tuple 1 probe corresponding to HIRA gene and commonly used for FISH  
15 detection of 22q11.21 deletion, is indicated. Black bars represent, from the top to the bottom,  
16 the ~3Mb most common 22q11 deletion associated with DGS/VCFS [63], the maximum  
17 length, between undeleted markers of the present study (case 2), the two cases reported by  
18 Cheroki and collaborators [21, 23] and that of Uliana and collaborators [24]. The grey bar  
19 shows the smallest 22q11.21 deletion common to known MRKH subjects.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Uterovaginal aplasia	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
Fallopian tubes agenesis/defects	No	No	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
Uni- or bi-lateral renal agenesis	No	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>	<b>Yes</b>
Heart malformation	No	No	No	<b>Yes</b>
Vertebral or limb defects	No	No	No	No
Hearing impairment	No	No	NA	NA
Learning disabilities	No	No	NA	NA
Chromosomal region of deletion	<b>4q34-qter</b>	<b>8p23.1</b>	<b>10p14-15.1</b>	<b>22q11.21</b>
Maximum size of the deletion (Mb)	<b>8</b>	<b>1.6</b>	<b>0.9</b>	<b>6</b>
Inherited	<b>Yes</b>	NA	<b>Yes</b>	No

**Table I.** Summary of phenotypic features, cytogenetic location and maximum size of the deletions in the four cases where a deletion was found. NA means “Not applicable”.



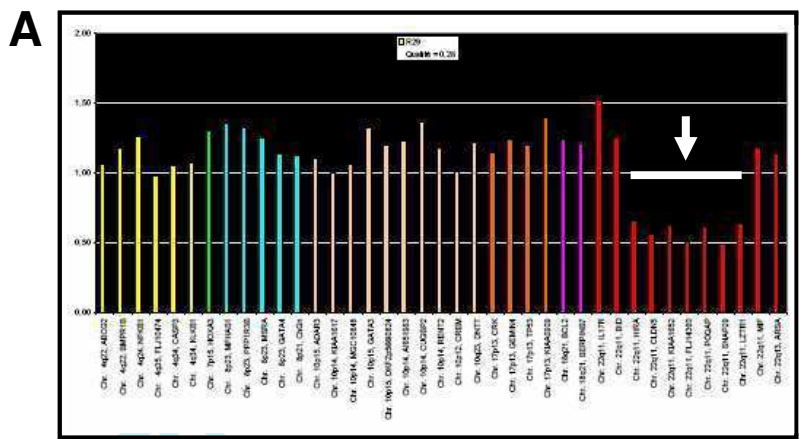
**Figure 1:** Summary of experimental investigations for cases 1, 3 and 4: (A) Multiplex Ligation-dependent PCR Amplification (MLPA) condensed results. Histograms represent allelic dosage of each target gene. Colors correspond to chromosomal regions of interest or used as internal control (Yellow: chromosome 4q, green: chromosome 7p15, blue: chromosome 8p, brown: chromosome 10p, orange: chromosome 17p, purple: chromosome 18q and red: chromosome 22q). White arrows show deletions (B) Confirmation and/or more accurate delineation by multiplex PCR/liquid chromatography (MP/LC). The hydroxymethylbilane synthase (HMBS) gene, located at 11q23.2-qter, was used as standard. Blue curve = control genomic DNA; red curve = genomic DNA from patient analyzed. Each gene of interest is written in bold above the corresponding curve; Std = standard gene. The red arrow shows allelic loss of the gene of interest. (C) Chromosomal and cytogenetic location of targeted genes. \* = gene names according to HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). Each gene of interest is provided together with its status (N = not deleted; **D** = deleted, - = not included in the MLPA kit), and its distance from the telomeric end of the short (p) or long (q) arm of the corresponding chromosome as well as its cytogenetic location according to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Map Viewer software.



**Figure 2:** Pedigree of the family with a female fetus resulting from a terminated pregnancy at 23 weeks gestation because of bilateral renal agenesis (case 2). Question marks indicate that phenotype of putative genetic carriers of the disease, is not known.

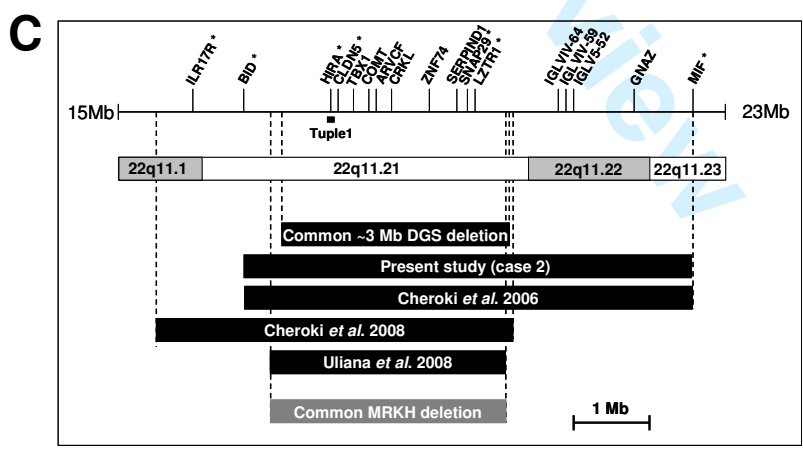


1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

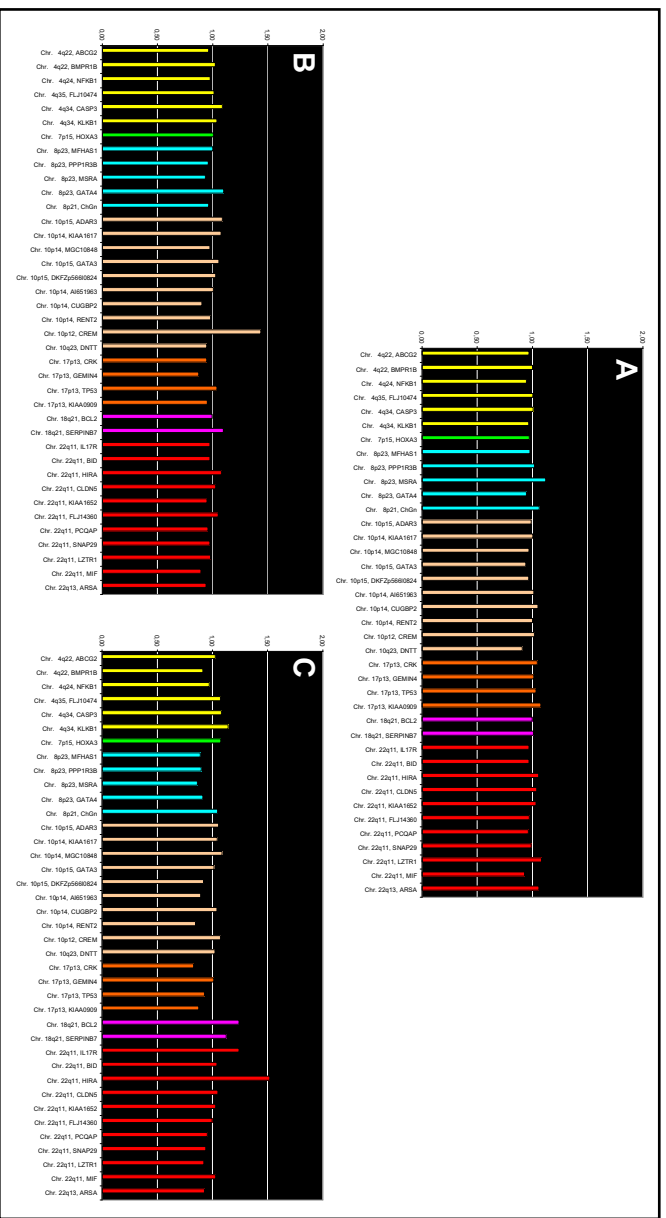


**B**

Gene of interest	Chromosome and cytogenetic location	Deleted
IL17R *	15.95 Mb (22q11.21)	N
BID *	16.61 Mb (22q11.21)	N
HIRA *	17.74 Mb (22q11.21)	D
CLDN5 *	17.88 Mb (22q11.21)	D
TXNRD2	18.27 Mb (22q11.21)	D
KLHL22	19.14 Mb (22q11.21)	D
PCQAP	19.22 Mb (22q11.21)	D
SNAP29 *	19.55 Mb (22q11.21)	D
LZTR1 *	19.67 Mb (22q11.21)	D
MIF *	22.56 Mb (22q11.23)	N
ARSA	49.41 Mb (22q13.33)	N



1  
2  
3 **Figure 3:** Summary of present (case 2) and previous mapping of chromosome 22q21.21  
4 deletions found in patients presenting with MRKH phenotypes. (A) Multiplex Ligation-  
5 dependent PCR Amplification (MLPA) condensed results. Histograms represent allelic  
6 dosage of each target gene. Colors correspond to chromosomal regions of interest or used as  
7 internal control (same as figure 2). The white arrow and horizontal bar indicate deleted  
8 markers. (B) Chromosomal and cytogenetic location of each chromosome 22 marker used in  
9 the MLPA experimental approach. Gene used as markers are named according to HUGO  
10 Gene Nomenclature Committee (HGNC); the asterisk indicate that the gene is also mentioned  
11 in part C of this figure. N = not deleted; D = deleted. (C) Schematic representation of the  
12 centromeric side of chromosome 22 long arm, between 15 and 23 Mb from the telomeric end  
13 of the short arm. Genes used as reference and/or as markers in the MLPA kit are indicated.  
14 The location of the Tuple 1 probe corresponding to HIRA gene and commonly used for FISH  
15 detection of 22q11.21 deletion, is indicated. Black bars represent, from the top to the bottom,  
16 the ~3Mb most common 22q11 deletion associated with DGS/VCFS [63], the maximum  
17 length, between undeleted markers of the present study (case 2), the two cases reported by  
18 Cherokee and collaborators [21, 23] and that of Uliana and collaborators [24]. The grey bar  
19 shows the smallest 22q11.21 deletion common to known MRKH subjects.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



**Figure 22. Profils MLPA d'individus sains obtenus à l'aide du kit SALSA<sup>®</sup> MLPA P023-DiGeorge.** A) Profil normal représentatif observé chez 98 individus sur 100. Aucune variation du nombre de copies des régions ciblées n'est constatée. B, C) Profil MLPA de deux individus sains (sans pathologie décrite) indiquant un polymorphisme de duplication, respectivement des marqueurs *CREM* en 10p12 et *HIRA* en 22q11.

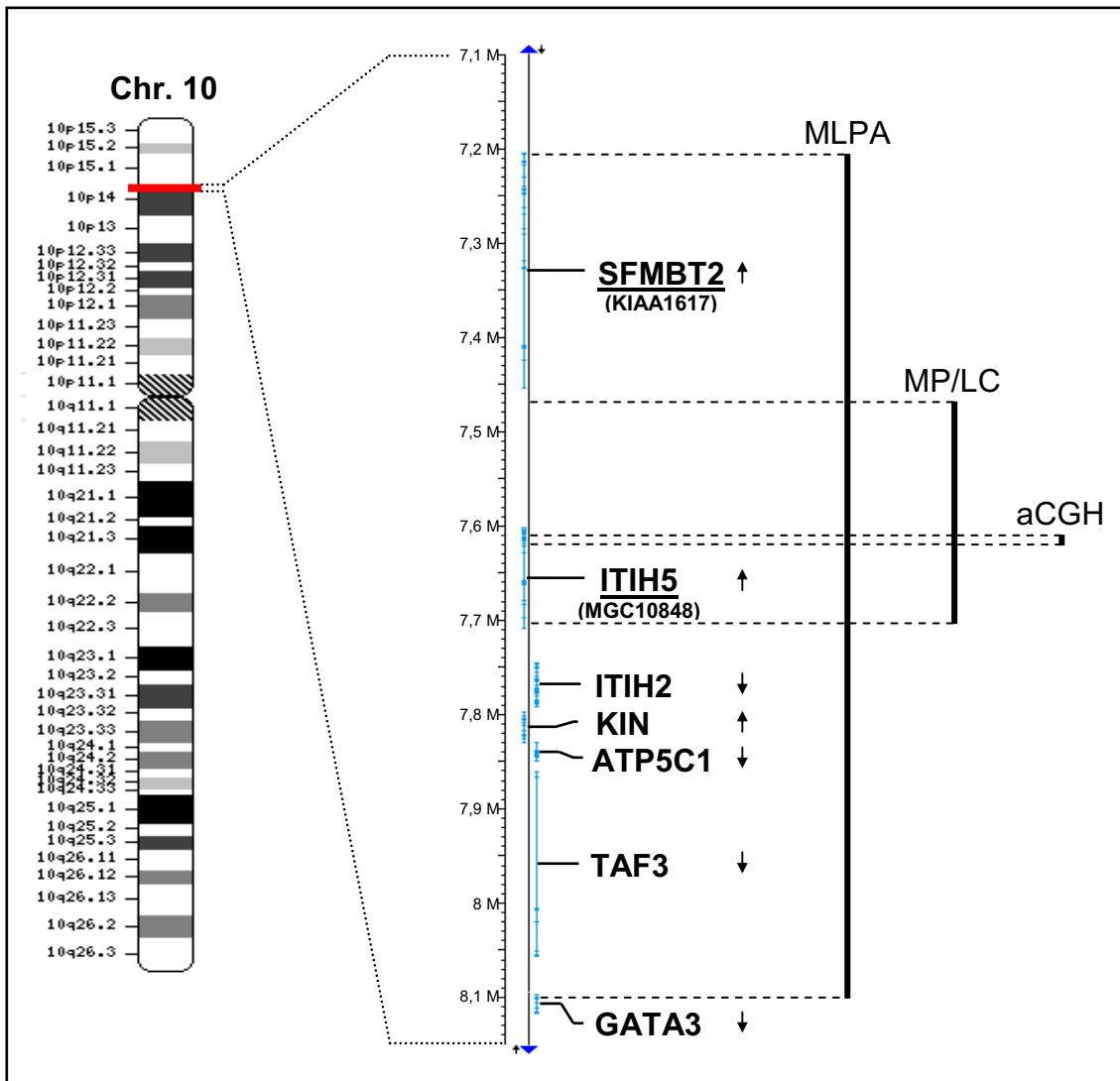
### 3) Microdélétions pathogéniques ou polymorphismes de grande taille ?

La prise en compte du polymorphisme génomique est devenue indispensable à la recherche en génétique médicale puisqu'elle permet de s'affranchir d'interprétations erronées dues à des variations génomiques non pathogéniques. Dans ce contexte, de nombreuses études ont été réalisées mettant en évidence l'existence de SNP (Single Nucleotide Polymorphism, variation interindividuelle d'un seul nucléotide), de microsatellites (répétitions d'une séquence de 2 à 5 nt) et de minisatellites (répétitions d'une séquence de 10 à 100 nt). Plus récemment, des polymorphismes de grande taille, concernant des régions génomiques de quelques kb à 2 Mb, dupliquées ou délétées et réparties dans tout le génome, ont été découverts chez des individus ne présentant aucune pathologie ni aucun phénotype particulier (Iafrate *et al.*, 2004; Sebat *et al.*, 2004). La connaissance de ce type de polymorphisme est donc d'un intérêt considérable en génétique humaine pour l'établissement de corrélations statistiques justes entre génotype et phénotype.

Afin d'exclure l'éventualité de microdélétions chromosomiques non pathogéniques et d'associer les hémizygotes détectées par MLPA aux différents phénotypes observés, une recherche de polymorphisme des régions ciblées par les sondes du kit MLPA P023 a été réalisée sur une population de 100 individus non apparentés et sans pathologie connue. Il ressort de ces expériences qu'une très grande majorité des individus testés (98/100) ne présente aucune variation du nombre de copies des régions étudiées (**Fig. 22-A**). En revanche, il a été constaté un polymorphisme de duplication chez deux sujets, au niveau de deux régions génomiques distinctes situées en 10p12.21 et 22q11.21 (**Fig. 22-B** et **22-C** respectivement), illustrant la complexité des variations génétiques dans le génome humain. Aucun des 100 individus testés ne présente néanmoins de polymorphismes délétionnels au sein des régions critiques du DGS. Ces résultats confortent notre hypothèse selon laquelle les microdélétions hémizygotiques au sein des 4 régions associées à un phénotype de type « DiGeorge » sont pathogéniques.

#### C) Identification d'*ITIH5* comme gène candidat du syndrome MRKH

Parmi les quatre microdélétions chromosomiques découvertes, la plus petite identifiée (d'une taille maximale de 0,9 Mb) touche la région sub-télomérique du bras court du chromosome 10 au sein de laquelle ont été décrits les loci (1) HDR1 (Hypoparathyroidism, Deafness, Renal dysplasia) dont l'hémizygotie est à l'origine de malformations congénitales notamment rénales (Lichtner *et al.*, 2000) et (2) DGCR2 (DiGeorge Critical Region 2)



**Figure 23. Bilan du bornage de la microdélétion observée chez un fœtus atteint de BRA et d'une aplasie utéro-vaginale.** La délimitation précise de la région délétée en 10p14-15.1 par la mise en œuvre successive des techniques de MLPA et de MP/LC nous a permis de constater que seule l'extrémité 3' du gène *ITIH5* (*Inter- $\alpha$ -Trypsin Inhibitor Heavy chain precursor 5*) est emportée. L'analyse sur puce à ADN 44k n'ayant montré aucune altération du nombre de copies des marqueurs situés dans le voisinage ou au sein du gène *ITIH5*, on peut par inférence en déduire que la taille maximale de cette microdélétion hémizygote est inférieure à 10 kb. A noter qu'aucune autre région n'a été trouvée délétée dans le génome entier.

(Schuffenhauer *et al.*, 1995) associé à des malformations cardiaques et thymiques. Comme le détaille l'article précédent, cette microdélétion a été détectée chez un fœtus de sexe féminin présentant une aplasie utéro-vaginale et interrompu à 23 semaines d'aménorrhée par IMG (Interruption Médicale de Grossesse) à cause d'une agénésie rénale bilatérale (Bilateral Renal Agenesis, BRA). Il existe dans cette famille des antécédents notoires puisque le père ainsi que ses deux filles montrent une aplasie rénale unilatérale (Unilateral Renal Agenesis, URA) isolée et que, par ailleurs, une cousine du père est également atteinte d'URA associée à une malformation utérine (hémi-utérus). Cette histoire familiale est hautement suggestive du syndrome d'adysplasie rénale héréditaire (Hereditary Renal Adysplasia, HRA – OMIM 191830), une pathologie transmise selon un mode autosomal dominant similaire à celui du syndrome MRKH mais très pénétrant. Une seconde famille au tableau clinique très similaire et intégrée au réseau PRAM a également été étudiée selon le même protocole de MLPA mais aucune anomalie chromosomique n'a été décelée avec les marqueurs génétiques utilisés dans ce kit. Néanmoins, la description de ces deux histoires familiales présente un grand intérêt pour nos recherches puisque, ajoutée à la littérature existante détaillant des cas familiaux d'URA ou de BRA associée à des anomalies müllériennes, elle renforce l'idée souvent évoquée d'un lien génétique entre les syndromes MRKH et HRA (Buchta *et al.*, 1973; Opitz, 1987; Battin *et al.*, 1993).

#### 1) Cartographie du locus 10p14-15.1

Cette microdélétion identifiée en 10p14-15.1 inclut un nombre très limité de gènes dont l'haploinsuffisance pourrait être responsable du phénotype rénal sévère ainsi que de l'aplasie utéro-vaginale affectant le fœtus ici étudié : *SFMBT2*, *ITIH5*, *ITIH2*, *KIN*, *ATP5C1*, *TAF3* et *GATA3* (**Figure 23**). La délimitation de cette microdélétion par une technique de PCR semi-quantitative (Multiplex PCR/Liquid Chromatography, MP/LC) a permis d'en exclure du côté télomérique le gène *SFMBT2* et, du côté centromérique, les gènes *ITIH2*, *KIN*, *ATP5C1*, *TAF3* et *GATA3*, puisque tous *a priori* présents en nombre normal de copies. L'une des deux bornes de la microdélétion, dont la taille maximale a été ainsi réduite à 230 kb, se situe dans la région séparant *SFMBT2* d'*ITIH5*. Le second point de cassure est lui localisé au sein même d'*ITIH5*, seule une partie du gène étant donc emportée par la microdélétion.

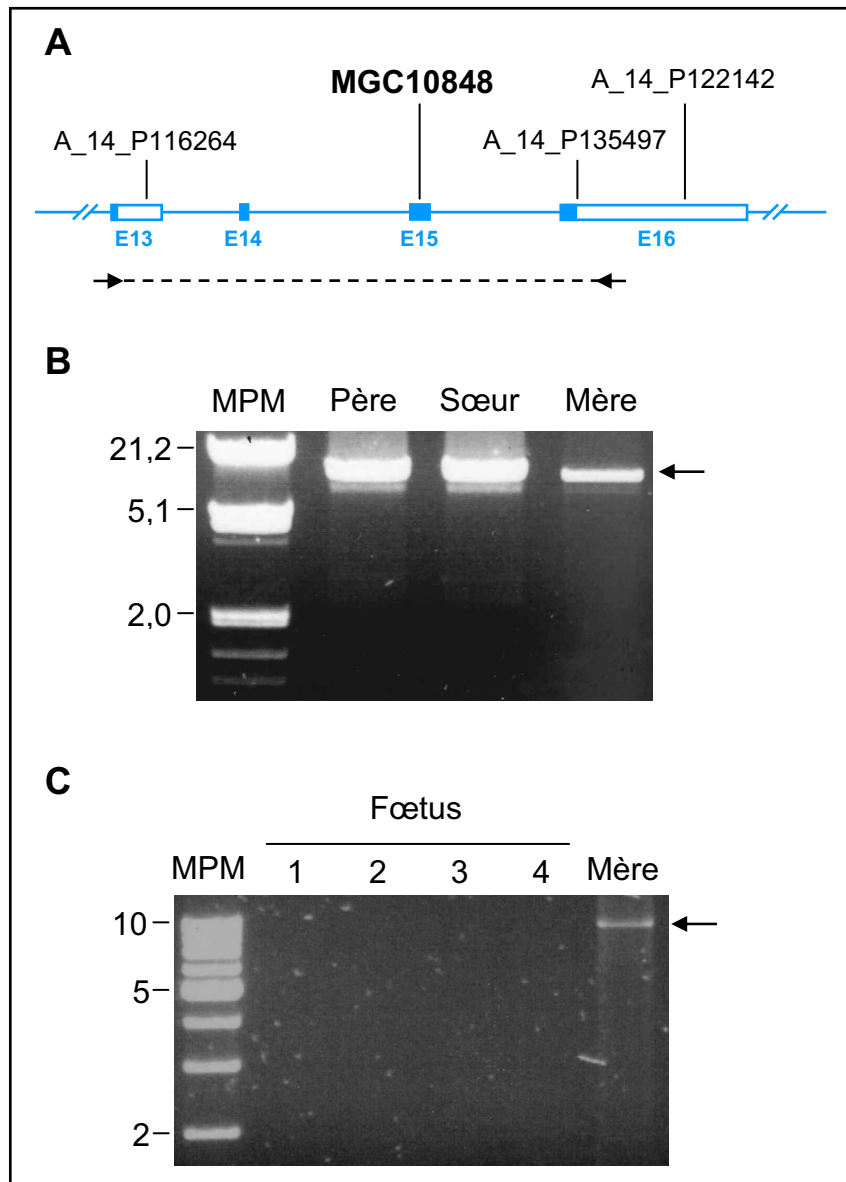
Une analyse par hybridation génomique comparative sur puce à ADN 44k (array Comparative Genomic Hybridization, aCGH) n'a par la suite révélé aucune variation

significative du nombre de copies de régions génomiques, tant au sein du locus 10p14-15.1 (Figure 23 ; Tableau 6) que dans le reste du génome.

**Tableau 6. Position au sein du chromosome 10 de marqueurs ciblés en MLPA ou aCGH et leur nombre de copies respectif chez le fœtus étudié.**

Marqueurs ou gènes ciblés	Technique associée	Localisation génomique (UCSC : assemblage février 2009)	Nombre de copies
<i>ADAR3</i>	MLPA	1,421 Mb	2
KIAA1617 ( <i>SFMBT2</i> )	MLPA	7,204 Mb	2
A_14_P135703	aCGH	7,386 Mb	2
A_14_P119944	aCGH	7,565 Mb	2
A_14_P122142	aCGH	7,603 Mb	2
<b>A_14_P135497</b>	<b>aCGH</b>	<b>7,604 Mb</b>	<b>2</b>
<b>MGC10848 (<i>ITIH5</i>)</b>	<b>MLPA</b>	<b>7,608 Mb</b>	<b>1</b>
<b>A_14_P116264</b>	<b>aCGH</b>	<b>7,613 Mb</b>	<b>2</b>
A_14_P110759	aCGH	7,617 Mb	2
A_14_P124349	aCGH	7,627 Mb	2
A_14_P131764	aCGH	7,684 Mb	2
A_14_P103126	aCGH	7,771 Mb	2
<i>GATA3</i>	MLPA	8,100 Mb	2
DKFZp566L0824	MLPA	10,548 Mb	2
AI651963	MLPA	10,977 Mb	2
<i>CUGBP2</i>	MLPA	11,207 Mb	2
<i>RENT2</i>	MLPA	11,978 Mb	2
<i>CREM</i>	MLPA	35,477 Mb	2
<i>DNTT</i>	MLPA	98,078 Mb	2

Les marqueurs A\_14\_P135497 et A\_14\_P116264 présents sur la puce à ADN 44k étant en nombre normal de copies chez le fœtus, la caractérisation de la microdélétion affectant le gène *ITIH5*, initialement détectée par MLPA puis confirmée par MP/LC, nous amène à la conclusion que cette microdélétion hémizygote est d'une taille inférieure à 10 kb. Afin d'en préciser exactement les points de cassure, une amplification par PCR a été réalisée sur l'ADN génomique du fœtus, de ses parents et de sa sœur avec des amorces oligonucléotidiques encadrant les marqueurs A\_14\_P135497 et A\_14\_P116264 non délétés, à l'aide du kit « PCR Extender System » (5Prime) selon les recommandations du fournisseur.



**Figure 24. Amplification par PCR de la région microdélétée maximale identifiée.** A) Représentation schématique de la structure génomique de l'extrémité 3' du gène *ITIH5* sur laquelle la position de marqueurs ciblés en MLPA (**MGC10848**) ou en aCGH est indiquée ainsi que la numérotation des exons. Les amorces oligonucléotidiques de PCR (flèches noires) s'hybrident dans les régions flanquantes des deux marqueurs de aCGH non délétés les plus proches de la sonde de MLPA MGC10848. B) Les produits de PCR obtenus pour les parents et la sœur du fœtus sont à la taille attendue, leur séquençage confirmant qu'il s'agit bien de la région d'intérêt. C) Aucun produit d'amplification n'a pu être détecté pour le fœtus, quelles que soient les conditions réactionnelles utilisées (pistes 1 et 2 : PCR avec 200 et 400 ng de matrice respectivement ; pistes 3 et 4 : PCR avec 2.5 mM et 4 mM MgCl<sub>2</sub> respectivement). MPM, Marqueur de Poids Moléculaire (taille exprimée en kb).



Les produits de PCR obtenus pour les membres de la famille du fœtus (**Figure 24**) sont à la taille attendue (9,5 kb), leur séquençage attestant qu'il s'agit bien de la région d'intérêt, *i.e.* l'extrémité 3' du gène *ITIH5*. En revanche, aucune réaction utilisant comme matrice l'ADN génomique du fœtus étudié n'a, de façon inattendue, permis une quelconque amplification. Ainsi, contrairement à notre hypothèse initiale d'une altération génomique monoallélique (microdélétion hémizygote), ce défaut d'amplification suggère une atteinte des deux allèles chez ce fœtus.

Ces observations posent avant tout la question des différents phénotypes observés au sein de cette famille. Il paraît raisonnablement sûr que le père est porteur d'une anomalie génétique monoallélique (indétectable par une analyse sur puce à ADN 44k) héritée de son père et transmise à ses deux filles et responsable de l'URA diagnostiquée chez ces trois sujets. Bien que le lien de causalité soit difficile à établir, l'une de nos hypothèses est que cet événement primaire, dont aurait également hérité le fœtus, implique un remaniement génomique de type inversion ou translocation altérant l'organisation du locus 10p14-15.1 et potentiellement générateur de microdélétions chez les descendants. Cette première altération aurait ainsi induit, par un mécanisme complexe de recombinaison, la microdélétion *de novo* observée chez le fœtus au sein du gène *ITIH5*, responsable d'une amplification du phénotype rénal (agénésie bilatérale) et/ou de l'aplasie utéro-vaginale. Il est à noter que cette région du bras court du chromosome 10 est particulièrement riche en séquences répétées de type LINEs (Long INterspersed nuclear Elements) et SINEs (Short INterspersed nuclear Elements) dont on sait qu'elles sont source d'instabilité génomique (Kazazian and Goodier, 2002; Deininger *et al.*, 2003). Une étude portant sur les mécanismes de recombinaison à l'origine des microdélétions observées au sein de la région 22q11 a, du reste, directement impliqué des séquences dupliquées, de type LCR (Low Copy Repeat) spécifiques du chromosome 22 (Shaikh *et al.*, 2000; Shaikh *et al.*, 2007).

A ce stade, des informations non plus quantitatives (ploïdie) mais qualitatives (organisation génomique) sont nécessaires pour corroborer notre hypothèse d'un double remaniement séquentiel du locus 10p14-15.1. Disposant, en plus de leur ADN génomique, de lignées lymphoblastoïdes pour une grande partie des individus vivants de notre cohorte, une étude par FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) à l'aide de deux sondes distantes couplées à des fluorochromes différents, et par Southern blot avec des sondes autour ou sur les points de cassure présumés sera conduite sur le fœtus et les membres de sa famille. Nous espérons ainsi être en mesure de corréler le phénotype de chacun à un réarrangement chromosomique

particulier ou à une combinaison de réarrangements. Une approche par séquençage à haut débit pourrait également être envisagée.

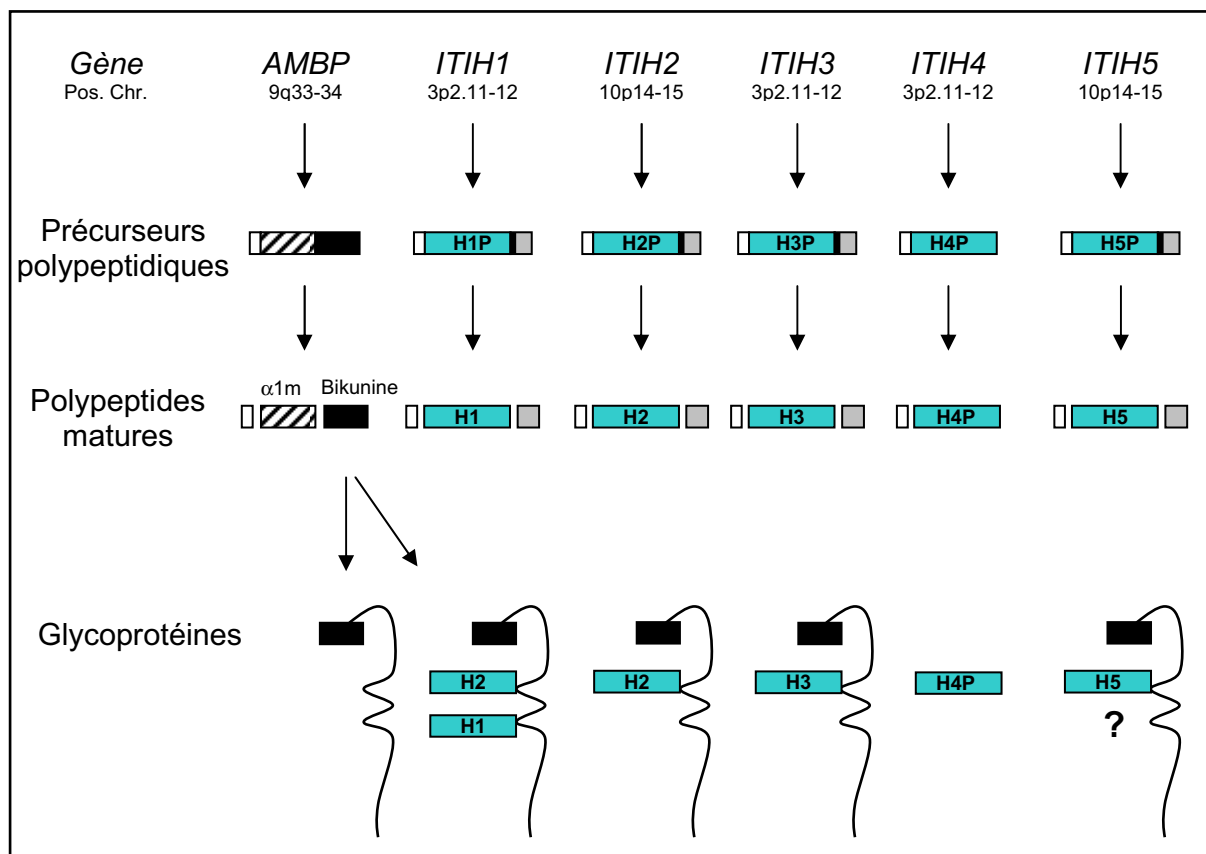
Les études familiales rapportées dans la littérature, en établissant un lien étiologique entre les syndromes MRKH et HRA, suggèrent que l'association d'anomalies rénales et müllériennes résulte (1) soit de l'expression variable d'une mutation autosomale dominante d'un seul et unique gène, (2) soit d'une combinaison variable de gènes affectés (délétés, dupliqués, mutés) (Opitz, 1987; Pavanello Rde *et al.*, 1988). En ce qui concerne le fœtus de notre famille d'intérêt, nos expériences suggèrent que l'haploinsuffisance du gène *ITIH5* pourrait être impliquée dans la survenue de malformations rénales et/ou génitales. Néanmoins, un effet de position altérant l'expression du gène *GATA3*, considéré comme le gène majeur du syndrome HDR (Van Esch *et al.*, 2000), ne peut être formellement exclu. De la même façon, une modification de l'expression de *BRUNOL3* (*alias CUGBB2*, **Tableau 6**), dont les transcrits sont détectés dans le mésonéphros et les néphrons au cours du développement humain (Lichtner *et al.*, 2002), pourrait être la cause de malformations rénales.

L'ensemble des observations obtenues jusqu'ici par l'étude génétique du locus 10p14-15.1 au sein de cette famille d'intérêt, où malformations rénales et génitales apparaissent génétiquement liées, suggère fortement que le gène *ITIH5* est un gène important pour le développement normal des dérivés mésonéphrotiques (reins) et/ou paramésonéphrotiques (tractus génital interne féminin). Afin de tester cette possibilité, nous avons étudié son profil d'expression spatio-temporel au cours de la mise en place et de la différenciation du tractus génital interne femelle chez la souris.

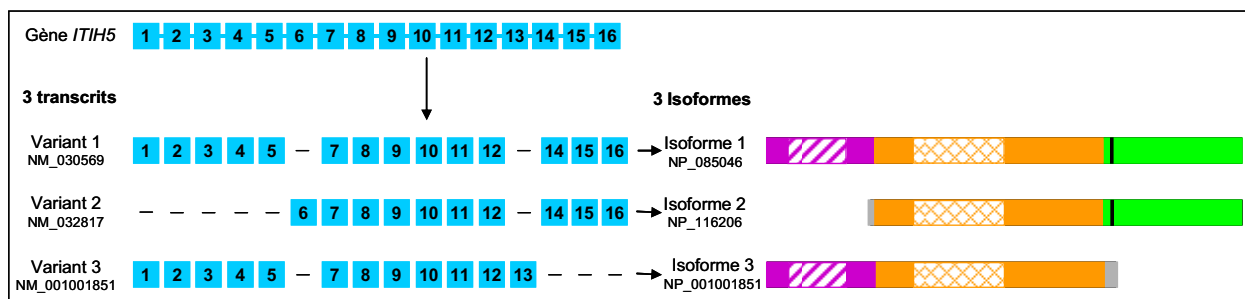
## 2) Analyse de l'expression du gène *ITIH5* au cours du développement du tractus génital interne murin

### 2-1) Généralités sur les protéines ITI

La famille ITI (Inter- $\alpha$ -Trypsin Inhibitor) recouvre un ensemble de protéines formées par l'assemblage d'une chaîne légère, la bikunine encodée par le gène *AMBP* (*Alpha-1-Microglobulin/Bikunin Precursor*), et d'une ou deux chaînes lourdes encodées par les gènes de la famille *ITIH* (*Inter- $\alpha$ -Trypsin Inhibitor Heavy Chain*). Cette famille est composée de 5 gènes paralogues organisés en deux clusters génomiques : *ITIH1*, *ITIH3* et *ITIH4* situés en 3p2.11-12, *ITIH2* et *ITIH5* en 10p14-15 chez l'Homme.



**Figure 25. La famille de protéines ITI : des gènes aux glycoprotéines.** Les gènes *ITIH* sont organisés en 2 clusters génomiques situés en 3p2.11-12 (*ITIH1*, -3 et -4) et 10p14-15 (*ITIH2* et -5) et codent pour les chaînes lourdes des protéines ITI. Après maturation des précurseurs polypeptidiques (HxP) par plusieurs clivages protéolytiques, les chaînes matures (Hx) – exceptée *ITIH4* - s’associent de manière covalente à la bikunine, chaîne légère encodée par le gène *AMBP* (*Alpha-1-Microglobulin* ( $\alpha 1m$ )/*Bikunin Precursor*), via une chaîne de chondroïtine sulfate (ligne courbe). Une analyse de la séquence protéique d’*ITIH5* révèle un site de clivage de l’extrémité C-terminale semblable à celui-ci des protéines *ITIH1*, -2 et -3, laissant supposer un clivage effectif de cette extrémité et une association subséquente à la bikunine (modifié d’après (Bost *et al.*, 1998)).



**Figure 26. *ITIH5* chez l’Homme : structure génomique, ARNm alternatifs et protéines correspondantes.** Trois ARNm alternatifs du gène *ITIH5* permettent la production d’isoformes protéiques différant par les modules qu’elles comportent. Zone hachurée violet = domaine VIT ; Zone hachurée orange = domaine vWA ; Zone noire = séquence de clivage.

Synthétisées au niveau hépatique à l'état de précurseurs polypeptidiques (Bourguignon *et al.*, 1989) puis véhiculées par la circulation systémique en interaction avec des protéines chaperons plasmatiques, seules les protéines ITIH1, -2 et -3, ont été démontrées capables de se lier à la bikunine de façon covalente, à l'issue de multiples modifications post-traductionnelles (**Figure 25**). La présence à l'extrémité C-terminale d'ITIH5 d'une séquence en acides aminés proche de celle du site de clivage des autres chaînes lourdes ITIH1, -2 et -3 laisse supposer qu'ITIH5 est également susceptible de s'associer à la bikunine.

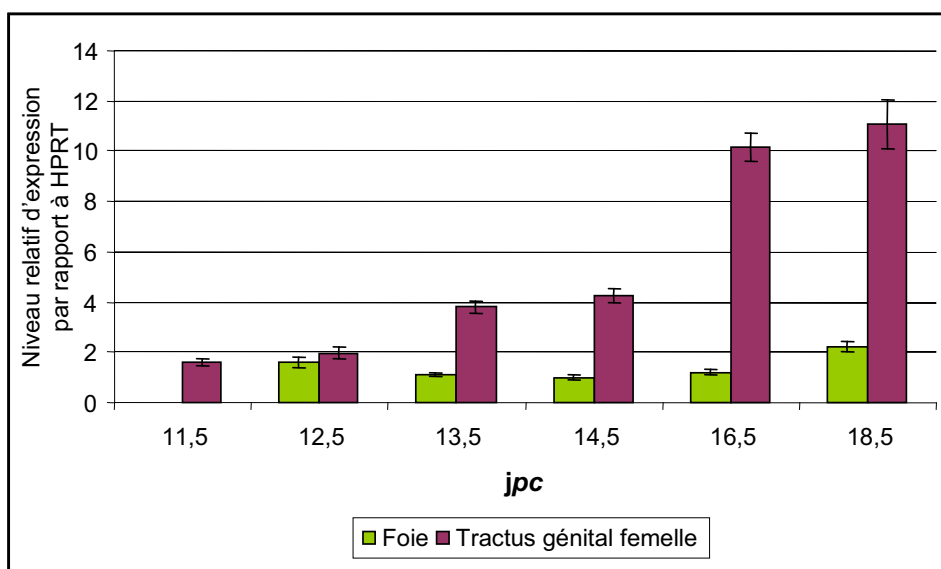
Initialement définies par leur activité inhibitrice de protéases, les protéines ITI semblent exercer un rôle majeur dans la stabilisation de la matrice extracellulaire (pour revue (Salier *et al.*, 1996)). Cet effet, qui dépend de l'association covalente des protéines ITI avec l'acide hyaluronique qu'elles organisent en une structure matricielle (Chen *et al.*, 1994), a été démontré dans des mécanismes physiologiques, tels que la maturation ovocytaire, ainsi que pathologiques comme les processus inflammatoires (Zhuo *et al.*, 2001).

## 2-2) Description du profil d'expression spatio-temporel d'*Itih5* chez la souris

Récemment caractérisé (Himmelfarb *et al.*, 2004), le gène *ITIH5*, qui comporte 16 exons, a été défini comme appartenant à la famille *ITIH* sur la base d'alignements de séquences protéiques. La protéine correspondante contient en effet deux domaines particuliers retrouvés chez tous les membres connus de la famille *ITIH* : un domaine VIT (Vault protein Inter- $\alpha$ -Trypsin) de fonction inconnue et un domaine vWA (von Willebrand type-A) capable de lier certains composants de la matrice extracellulaire (Colombatti and Bonaldo, 1991).

Une analyse bio-informatique du gène *ITIH5* humain *via* le serveur NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) montre que celui-ci est sujet à des événements d'épissage alternatif aboutissant à la formation de trois ARNm possibles (**Figure 26**). Les protéines correspondantes, qui contiennent toutes le domaine vWA, diffèrent par la présence ou non du domaine VIT à leur extrémité N-terminale et du site de clivage protéolytique à leur extrémité C-terminale, suggérant des fonctions différentes entre isoformes.

Aucune étude n'a à ce jour véritablement approché la fonction d'*ITIH5*. Néanmoins, ses découvreurs ont observé une diminution de son expression liée à une hyperméthylation de son promoteur dans des cas de cancers du sein, suggérant qu'*ITIH5* est un gène suppresseur de tumeurs (Himmelfarb *et al.*, 2004; Veeck *et al.*, 2008).



**Figure 27. Etude par RT-PCR quantitative du profil d'expression d'*Itih5* dans le foie et le tractus génital femelle au cours de l'embryogenèse chez la souris.** L'expression du gène *Itih5* augmente au cours de la mise en place et de la différenciation du tractus génital femelle et est environ 5 fois supérieure à celle du foie à 18,5 jours de gestation. Par ailleurs, une telle dynamique d'expression n'est pas retrouvée au cours de l'organogenèse hépatique, suggérant un rôle prépondérant d'*Itih5* au cours du développement des voies génitales internes chez l'embryon femelle.

Dans l'objectif de corroborer notre hypothèse selon laquelle le gène *ITIH5* est un gène candidat du syndrome MRKH, une étude préliminaire de son profil d'expression spatio-temporel a été conduite au cours du développement du tractus génital interne chez la souris. Cette analyse reposant sur les techniques précédemment introduites de RT-PCRq et d'hybridation *in situ* sur organes isolés (Cf. 1<sup>ère</sup> partie), les protocoles expérimentaux mis en œuvre ne seront donc pas détaillés.

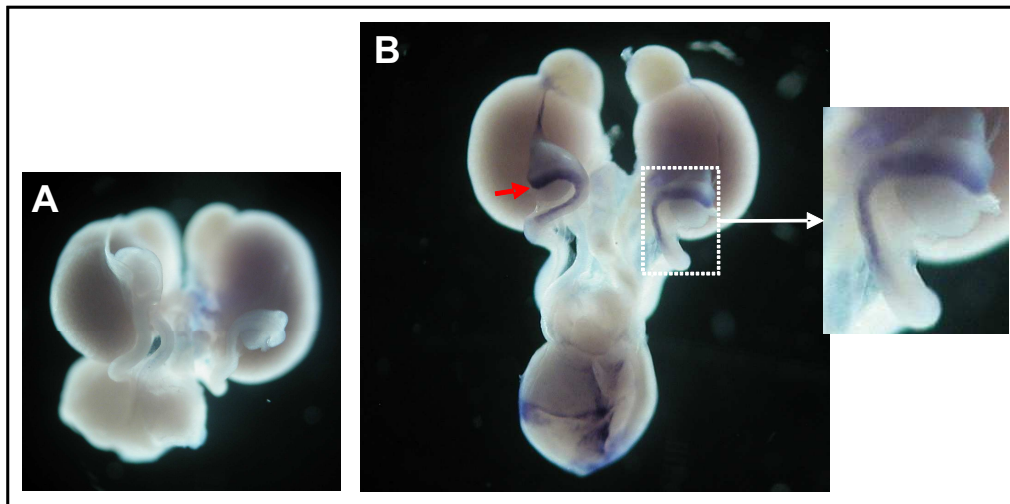
2-2-1) Quantification par RT-PCRq du niveau d'expression d'*Itih5* au cours de la mise en place et de la différenciation du tractus génital interne femelle.

L'analyse de l'expression d'*Itih5* au cours du développement embryonnaire des voies génitales internes femelles a été réalisée par RT-PCR quantitative à l'aide d'amorces oligonucléotidiques s'hybridant dans les exons 2 et 4 du gène et dont les séquences (5'-3') sont les suivantes : TGAAGACCAGGAGGCTGAGTTC et CACCCCGATACACGCTGTC. Les valeurs sont normalisées par rapport au niveau d'expression du gène *Hprt1* considéré comme invariant.

Les résultats obtenus (**Figure 27**) montrent que le niveau de transcription du gène *Itih5* augmente de façon relativement importante entre 11,5 jours et 18,5 jours de gestation, la quantité relative d'ARNm étant multipliée par un facteur 5 entre ces deux stades développementaux. On constate en outre que son niveau d'expression au stade 18,5 *jpg* est environ 5 fois supérieure à celle du foie au même stade. Cette expression dynamique, qui n'est pas retrouvée dans le foie en cours de développement, n'est pas non plus constatée pour le gène *Itih2* (données provenant de K. Morcel, thèse de science 2009). Cette dernière observation suggère que les gènes *Itih5* et *Itih2*, en orientation inverse dans les génomes humain et murin, sont soumis à des régulations transcriptionnelles distinctes liées à des séquences régulatrices vraisemblablement différentes au sein de leur promoteur respectif.

Cet aspect dynamique de l'expression d'*Itih5* au cours de l'embryogenèse suggère que ce gène est important pour le développement normal du tractus génital femelle, une hypothèse renforcée par l'observation d'un niveau d'expression locale bien supérieur à celui du foie embryonnaire pourtant considéré comme le lieu de synthèse majeur des protéines ITI.

Ces premières données vont dans le sens de notre hypothèse initiale selon laquelle le gène *ITIH5* est bel et bien un gène candidat du syndrome MRKH, *i.e.* dont l'haploinsuffisance provoque une aplasie utéro-vaginale congénitale.



**Figure 28. *Itih5* est spécifiquement exprimé dans la partie antérieure des dérivés müllériens en cours de différenciation. A, B) Vues ventrales de tractus urogénitaux femelles isolés au stade 17,5 *jpc* hybridés respectivement avec une ribosonde sens et une ribosonde antisens spécifiques d'*Itih5*. L'analyse par hybridation *in situ* de l'expression du gène *Itih5* révèle un marquage très spécifique de la partie crâniale des canaux de Müller (B, flèche rouge) après 17,5 jours de gestation. Cette expression extrêmement localisée suggère fortement que les produits de ce gène sont impliqués dans le processus de différenciation du tractus génital interne femelle.**

## 2-2-2) Caractérisation de l'expression spatiale d'*Itih5* par HIS

Afin d'obtenir des informations sur les territoires précis d'expression d'*Itih5* dans le tractus urogénital femelle en cours de développement, des expériences d'hybridation *in situ* sur des tractus urogénitaux isolés ont été réalisées à l'aide d'une ribosonde marquée par la digoxygénine et couvrant les exons 2, 3 et 4 du gène *Itih5*. Les résultats présentés ici sont le fruit d'un travail mené en collaboration avec K. Morcel lors de sa thèse, au cours d'une étude plus complète à laquelle j'ai contribué.

Cette étude d'expression d'*Itih5* montre un marquage très spécifique de la partie crâniale des dérivés müllériens au stade 17,5 *jpc* (**Figure 28**), *i.e.* lors du processus de différenciation des voies génitales internes femelles. L'identité précise des cellules exprimant *Itih5* reste inconnue malgré des expériences d'hybridation *in situ* sur coupes d'embryon. Aucune autre structure urogénitale ne semble exprimer ce gène, le marquage observé au niveau de la vessie étant vraisemblablement lié à la propension des ribosondes à se fixer aux tissus lésés lors de la microdissection.

Cette expression très localisée d'*Itih5* au sein des structures antérieures des canaux de Müller en cours de développement est un indice de plus quant à l'importance supposée de ce gène dans les mécanismes de différenciation génitale chez la femelle.

## D) Discussion - perspectives

Longtemps sujet à controverses, il est admis désormais que l'étiologie du syndrome MRKH est d'origine génétique. Au début de notre étude, l'absence d'altérations génomiques décrites comme associées à l'aplasie utéro-vaginale, ainsi que le côté incertain d'une stratégie de type gène candidat (van Lingen *et al.*, 1998a; van Lingen *et al.*, 1998b; Resendes *et al.*, 2001; Burel *et al.*, 2006), nous ont conduits à mettre en œuvre une approche plus globale, en ciblant des loci candidats plutôt que des gènes. L'hypothèse de départ sur laquelle se fonde notre étude est que le syndrome MRKH est génétiquement lié au DGS, ces deux syndromes présentant des caractères phénotypiques chevauchants. La recherche d'anomalies génomiques sur une large cohorte de patientes atteintes par le syndrome MRKH nous a permis d'observer des microdélétions hémizygotiques au sein des régions critiques du DGS, confortant notre hypothèse d'un lien étiologique entre ces deux syndromes. L'étude d'une population saine (sans pathologie connue) n'a révélé aucun polymorphisme délétionnel dans ces mêmes régions, suggérant fortement que les microdélétions identifiées sont bien pathogéniques.



Les malformations diagnostiquées dans ces deux syndromes atteignent des structures anatomiques dérivées du mésoderme intermédiaire. L'association non aléatoire de ces anomalies congénitales s'explique donc probablement par une atteinte mésodermique très précoce (Wulfsberg and Grigbsy, 1990). Etant donné l'aspect phénotypiquement très variable du syndrome MRKH, il est très probable que l'impact de cette affection mésodermique dépende non seulement de la nature de cette altération génétique mais également du fond génétique spécifique à chaque individu.

L'analyse des régions microdélétées identifiées chez des individus non apparentés atteints du syndrome MRKH nous a permis de définir plusieurs gènes candidats inclus dans ces microdélétions et dont l'haploinsuffisance pourrait être responsable de l'aplasie utéro-vaginale congénitale.

Le gène *FAT*, inclus dans la délétion de la région 4q34-qter identifiée chez une mère et sa fille, apparaît comme un candidat possible (Bendavid *et al.*, 2007). En effet, ce gène suppresseur de tumeur exerce plusieurs fonctions essentielles, notamment dans les interactions entre cellules (Dunne *et al.*, 1995; Tanoue and Takeichi, 2005) mais également dans les mécanismes de tubulogenèse (Castillejo-Lopez *et al.*, 2004). Particulièrement importants au cours du développement embryonnaire, ces deux processus cellulaires, s'ils sont altérés, pourraient compromettre la différenciation des canaux de Müller et aboutir à une aplasie utéro-vaginale. De plus, l'haploinsuffisance du gène *FAT* pourrait également rendre compte du cancer gynécologique particulièrement rare dont est affectée la mère de notre patiente (cancer des trompes) et qui, de plus, s'est déclaré de façon contemporaine dans les deux trompes, suggérant un mécanisme non aléatoire mais plutôt lié à un fond génétique particulier.

Concernant la microdélétion de la région 8p23.1, aucun des gènes emportés ne paraît *a priori* pouvoir être impliqué dans l'apparition du syndrome MRKH. Un microARN, MIR597, assigné récemment dans cette région pourrait constituer un candidat potentiel. Il a en effet été montré que l'inactivation conditionnelle dans les cellules du mésenchyme péri-müllérien de la ribonucléase Dicer, nécessaire à la synthèse des microARN, provoque des défauts de différenciation du tractus reproducteur femelle, indiquant un rôle important des microARN dans ce processus (Hong *et al.*, 2008; Gonzalez and Behringer, 2009). Plus généralement, les microARN sont impliqués dans la régulation des mécanismes développementaux et de différenciation (Suh *et al.*, 2004). Le microARN MIR124-1, également présent dans la région

8p23.1 microdélétée, n'est exprimé *a priori* que dans le cerveau et n'est donc pas retenu comme candidat.

Le cas de la microdélétion identifiée au sein de la région 10p14-15.1 est particulier puisque sa délimitation nous a permis d'observer qu'elle n'affecte qu'un seul gène, *ITIH5*, dans sa partie codante. L'étude par RT-PCRq du profil d'expression temporel de ce gène candidat au syndrome MRKH a montré que son expression augmente fortement au cours du développement des canaux de Müller. Des expériences complémentaires d'hybridation *in situ* ont permis de localiser cette expression à l'extrémité antérieure des canaux müllériens. Ces observations nous confortent dans l'hypothèse que le gène *ITIH5* joue un rôle important au cours de la différenciation des canaux de Müller et qu'il pourrait être impliqué dans la survenue d'une aplasie utéro-vaginale en cas d'haploinsuffisance. La prochaine étape consistera en l'inactivation fonctionnelle du gène *Itih5* chez la souris afin de confirmer ce rôle puis, en cas de reproduction expérimentale du syndrome MRKH chez la souris, d'analyser les mécanismes développementaux défectueux.

Enfin, la délétion caractérisée en 22q11.21 chez un fœtus, atteint du syndrome MRKH et présentant plusieurs autres malformations congénitales, corrobore des observations rapportées dans la littérature faisant état d'une association entre l'aplasie utéro-vaginale et la microdélétion de cette région (Cheroki *et al.*, 2006; Sundaram *et al.*, 2007; Uliana *et al.*, 2008). La zone minimale commune de ces microdélétions correspond à celle retrouvée communément dans le « chromosome 22q11.2 deletion syndromes », suggérant que l'aplasie utéro-vaginale fait partie du spectre cliniquement très variable de malformations associées à une délétion hémizygote de cette région chromosomique.

En résumé, la constatation d'un chevauchement des spectres phénotypiques du syndrome MRKH et du DGS nous a conduits à l'identification de microdélétions affectant des régions communes dans ces deux syndromes. Cette observation suggère (1) qu'ils constituent un syndrome de gènes contigus ou (2) que l'aplasie utéro-vaginale fait partie intégrante de syndromes délétionnels dont les manifestations cliniques sont très variables d'un individu à l'autre. D'après les résultats de notre étude, il semble que ces deux alternatives ne sont pas exclusives, le choix entre l'une ou l'autre de ces conditions dépendant probablement de la région génomique considérée.

La mise en place du réseau PRAM de recherches cliniques nous a ainsi permis, outre de fédérer les compétences de cliniciens et de généticiens autour cette problématique, de réaliser l'étude génétique du syndrome MRKH sur une cohorte importante de patientes et de

caractériser quatre microdélétions distinctes, très probablement pathogéniques. Bien qu'il ne soit pas formellement exclu que cette pathogénicité soit liée à une altération transcriptionnelle des gènes situés au voisinage de ces microdélétions, une hypothèse déjà avancée pour d'autres pathologies humaines (Elizondo *et al.*, 2009), plusieurs gènes inclus dans ces microdélétions sont apparus comme des candidats potentiels de ce syndrome. Dans ce cadre, le gène *ITIH5* se révèle notamment très prometteur.

Aucune altération génomique n'ayant été décelée par MLPA chez une très grande majorité de patientes intégrées à l'étude, il semble nécessaire de mettre en œuvre des techniques de dosage génique permettant de cribler l'ensemble du génome. Dans cette optique, l'hybridation génomique comparative sur puce apparaît une technique de choix dans la recherche de nouvelles délétions mais également dans la délimitation plus précise des régions d'ores et déjà identifiées. En absence de toute altération du nombre de copies des régions déjà candidates ou à venir, la recherche de modifications de l'organisation génomique au niveau de ces loci (inversion, translocation) par FISH ou Southern blot pourrait se révéler très informative. Cette stratégie, associée à une cohorte de patientes sans cesse grandissante, devrait nous permettre l'établissement de corrélations génotype/phénotype solides indispensables aux cliniciens, et nous mener à l'identification de nouveaux gènes candidats potentiellement impliqués dans le syndrome MRKH.

# **Conclusion générale**

## Conclusion générale

Cette étude portant sur les mécanismes moléculaires et cellulaires du développement du tractus reproducteur femelle s'est appuyée sur une stratégie mêlant recherche fondamentale et recherche clinique, dans l'objectif d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le développement normal et dans les processus pathogéniques à l'origine de malformations congénitales de cet organe.

Les résultats présentés dans la première partie de ce manuscrit, au cours de l'étude du développement sexuellement dimorphique du tractus génital interne chez la souris, soutiennent les multiples observations rapportées dans la littérature démontrant le rôle majeur de la voie de signalisation Wnt dans ce processus développemental. Dans ce cadre, nos études ont montré que différentes isoformes protéiques du gène *mTcf712*, générées par épissage alternatif, sont exprimées au cours de ce processus. Plus particulièrement, certains produits de ce gène ont été détectés dans les canaux de Müller chez l'embryon femelle, suggérant fortement que cet effecteur terminal de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, par ses propriétés de co-facteur transcriptionnel, participe à la régulation des mécanismes de différenciation des ébauches embryonnaires des voies génitales internes femelles. Des études fonctionnelles sont maintenant requises afin de déterminer, en fonction d'un tissu ou d'un type cellulaire donné, le rôle précis de ces différentes isoformes dans les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la mise en place du tractus reproducteur et son développement sexuellement dimorphique. Les diverses fonctions cellulaires possibles des isoformes protéiques de *mTcf712* pourraient survenir à différents niveaux : détermination cellulaire, contrôle de la balance prolifération/différenciation et survie/apoptose, modulation de la morphologie cellulaire et de l'adhésion... Il est à noter que ces mécanismes cellulaires nécessitent d'être précisément et spécifiquement régulés au cours du processus de tubulogenèse, fondamental pour générer les structures tubulaires des tractus génitaux internes mâle et femelle, ainsi que les reins et les testicules. Il semble que dans ce cadre nous ayons apporté des éléments supplémentaires.

Le deuxième axe développé en parallèle de l'étude menée chez la souris a consisté en la recherche des causes génétiques du syndrome MRKH sur une cohorte de patientes volontaires, recrutées dans le cadre d'un réseau national de recherches cliniques. La

description précise par les cliniciens du réseau des différentes malformations associées à l'aplasie utéro-vaginale congénitale chez ces patientes a permis de constater un chevauchement phénotypique entre le syndrome MRKH et le syndrome de DiGeorge (DGS), suggérant un lien étiologique entre ces deux syndromes polymalformatifs d'origine multigénique. La mise en œuvre de différentes techniques de dosage génique (MLPA, MP/LC, aCGH) nous a permis de caractériser, chez quatre patientes non apparentées, quatre microdélétions hémizygotiques au sein des régions critiques du DGS : 4q34-qter, 8p23.1, 10p14-15.1, 22q11.21. Cette observation suggère que ces deux pathologies malformatives correspondent à une seule et même entité clinique phénotypiquement très variable ou constituent des syndromes dits de gènes contigus, ces deux hypothèses pouvant s'avérer valables et dépendre de la région génomique considérée. L'analyse des gènes emportés par ces microdélétions, dont l'haploinsuffisance potentielle serait responsable d'une atteinte mésodermique précoce à l'origine des multiples malformations observées, nous a conduits à l'identification d'*ITIH5* comme gène candidat au syndrome MRKH. Les résultats préliminaires obtenus par l'étude de son profil d'expression spatio-temporel chez la souris renforcent notre hypothèse selon laquelle le gène *ITIH5* joue un rôle spécifique au cours de la différenciation des canaux de Müller, son expression étant en outre particulièrement élevée dans cet organe. Son inactivation fonctionnelle sur le modèle murin sera la prochaine étape dans la validation de son implication dans le développement des voies génitales internes femelles.

En résumé, la mise en place du tractus génital interne femelle repose sur la coordination précise de mécanismes moléculaires et cellulaires impliquant une multitude de gènes et de voies de signalisation interdépendants. Le développement de stratégies associant recherche fondamentale et clinique devrait permettre, à l'avenir, de mieux définir la cascade d'événements moléculaires régulant ce processus développemental.

# **Bibliographie**

## Bibliographie

- (1988). The American Fertility Society classifications of adnexal adhesions, distal tubal occlusion, tubal occlusion secondary to tubal ligation, tubal pregnancies, mullerian anomalies and intrauterine adhesions. *Fertil Steril* **49**, 944-55.
- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* **16**, 3797-804.
- Allard, S., Adin, P., Gouedard, L., di Clemente, N., Josso, N., Orgebin-Crist, M. C., Picard, J. Y., and Xavier, F. (2000). Molecular mechanisms of hormone-mediated Mullerian duct regression: involvement of beta-catenin. *Development* **127**, 3349-60.
- Arango, N. A., Kobayashi, A., Wang, Y., Jamin, S. P., Lee, H. H., Orvis, G. D., and Behringer, R. R. (2008). A mesenchymal perspective of Mullerian duct differentiation and regression in Amhr2-lacZ mice. *Mol Reprod Dev* **75**, 1154-62.
- Arce, L., Yokoyama, N. N., and Waterman, M. L. (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* **25**, 7492-504.
- Barker, N., Hurlstone, A., Musisi, H., Miles, A., Bienz, M., and Clevers, H. (2001). The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *Embo J* **20**, 4935-43.
- Battin, J., Lacombe, D., and Leng, J. J. (1993). Familial occurrence of hereditary renal adysplasia with mullerian anomalies. *Clin Genet* **43**, 23-4.
- Behm-Ansmant, I., Kashima, I., Rehwinkel, J., Sauliere, J., Wittkopp, N., and Izaurralde, E. (2007). mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Lett* **581**, 2845-53.
- Behrens, J., Jerchow, B. A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kuhl, M., Wedlich, D., and Birchmeier, W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* **280**, 596-9.
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638-42.
- Bendavid, C., Pasquier, L., Watrin, T., Morcel, K., Lucas, J., Gicquel, I., Dubourg, C., Henry, C., David, V., Odent, S., Leveque, J., Pellerin, I., and Guerrier, D. (2007). Phenotypic variability of a 4q34-->qter inherited deletion: MRKH syndrome in the daughter, cardiac defect and Fallopian tube cancer in the mother. *Eur J Med Genet* **50**, 66-72.
- Benson, G. V., Lim, H., Paria, B. C., Satokata, I., Dey, S. K., and Maas, R. L. (1996). Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* **122**, 2687-96.
- Bost, F., Diarra-Mehrpour, M., and Martin, J. P. (1998). Inter-alpha-trypsin inhibitor proteoglycan family--a group of proteins binding and stabilizing the extracellular matrix. *Eur J Biochem* **252**, 339-46.
- Bourguignon, J., Sesboue, R., Diarra-Mehrpour, M., Daveau, M., and Martin, J. P. (1989). Human inter-alpha-trypsin inhibitor. Synthesis and maturation in hepatoma HepG2 cells. *Biochem J* **261**, 305-8.
- Brannon, M., Brown, J. D., Bates, R., Kimelman, D., and Moon, R. T. (1999). XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout Xenopus development. *Development* **126**, 3159-70.
- Brinkmeier, M. L., Potok, M. A., Davis, S. W., and Camper, S. A. (2007). TCF4 deficiency expands ventral diencephalon signaling and increases induction of pituitary progenitors. *Dev Biol* **311**, 396-407.



- Brisken, C., Heineman, A., Chavarria, T., Elenbaas, B., Tan, J., Dey, S. K., McMahon, J. A., McMahon, A. P., and Weinberg, R. A. (2000). Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev* **14**, 650-4.
- Brunner, E., Peter, O., Schweizer, L., and Basler, K. (1997). pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* **385**, 829-33.
- Buchta, R. M., Viseskul, C., Gilbert, E. F., Sarto, G. E., and Opitz, J. M. (1973). Familial bilateral renal agenesis and hereditary renal adysplasia. *Z Kinderheilkd* **115**, 111-29.
- Burel, A., Mouchel, T., Odent, S., Tiker, F., Knebelmann, B., Pellerin, I., and Guerrier, D. (2006). Role of HOXA7 to HOXA13 and PBX1 genes in various forms of MRKH syndrome (congenital absence of uterus and vagina). *J Negat Results Biomed* **5**, 4.
- Capel, B. (2000). The battle of the sexes. *Mech Dev* **92**, 89-103.
- Carter, M. S., Doskow, J., Morris, P., Li, S., Nhim, R. P., Sandstedt, S., and Wilkinson, M. F. (1995). A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J Biol Chem* **270**, 28995-9003.
- Castillejo-Lopez, C., Arias, W. M., and Baumgartner, S. (2004). The fat-like gene of *Drosophila* is the true orthologue of vertebrate fat cadherins and is involved in the formation of tubular organs. *J Biol Chem* **279**, 24034-43.
- Chang, H., Gao, F., Guillou, F., Taketo, M. M., Huff, V., and Behringer, R. R. (2008). Wt1 negatively regulates beta-catenin signaling during testis development. *Development* **135**, 1875-85.
- Chen, G., Fernandez, J., Mische, S., and Courey, A. J. (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev* **13**, 2218-30.
- Chen, L., Mao, S. J., McLean, L. R., Powers, R. W., and Larsen, W. J. (1994). Proteins of the inter-alpha-trypsin inhibitor family stabilize the cumulus extracellular matrix through their direct binding with hyaluronic acid. *J Biol Chem* **269**, 28282-7.
- Cheroki, C., Krepischi-Santos, A. C., Rosenberg, C., Jehee, F. S., Mingroni-Netto, R. C., Pavanello Filho, I., Zanforlin Filho, S., Kim, C. A., Bagnoli, V. R., Mendonca, B. B., Szuhai, K., and Otto, P. A. (2006). Report of a del22q11 in a patient with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) anomaly and exclusion of WNT-4, RAR-gamma, and RXR-alpha as major genes determining MRKH anomaly in a study of 25 affected women. *Am J Med Genet A* **140**, 1339-42.
- Cho, E. A., and Dressler, G. R. (1998). TCF-4 binds beta-catenin and is expressed in distinct regions of the embryonic brain and limbs. *Mech Dev* **77**, 9-18.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469-80.
- Colombatti, A., and Bonaldo, P. (1991). The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood* **77**, 2305-15.
- Connolly, D. C., Bao, R., Nikitin, A. Y., Stephens, K. C., Poole, T. W., Hua, X., Harris, S. S., Vanderhyden, B. C., and Hamilton, T. C. (2003). Female mice chimeric for expression of the simian virus 40 TAg under control of the MISIR promoter develop epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* **63**, 1389-97.
- Cuneo, B. F. (2001). 22q11.2 deletion syndrome: DiGeorge, velocardiofacial, and conotruncal anomaly face syndromes. *Curr Opin Pediatr* **13**, 465-72.
- Daftary, G. S., and Taylor, H. S. (2006). Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr Rev* **27**, 331-55.

- Daniels, D. L., and Weis, W. I. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 364-71.
- Deininger, P. L., Moran, J. V., Batzer, M. A., and Kazazian, H. H., Jr. (2003). Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 651-8.
- Deutscher, E., and Hung-Chang Yao, H. (2007). Essential roles of mesenchyme-derived beta-catenin in mouse Mullerian duct morphogenesis. *Dev Biol* **307**, 227-36.
- Devriendt, K., De Mars, K., De Cock, P., Gewillig, M., and Fryns, J. P. (1995). Terminal deletion in chromosome region 8p23.1-8pter in a child with features of velo-cardio-facial syndrome. *Ann Genet* **38**, 228-30.
- Devriendt, K., Matthijs, G., Van Dael, R., Gewillig, M., Eyskens, B., Hjalgrim, H., Dolmer, B., McGaughran, J., Brondum-Nielsen, K., Marynen, P., Fryns, J. P., and Vermeesch, J. R. (1999). Delineation of the critical deletion region for congenital heart defects, on chromosome 8p23.1. *Am J Hum Genet* **64**, 1119-26.
- Douglas, K. R., Brinkmeier, M. L., Kennell, J. A., Eswara, P., Harrison, T. A., Patrianakos, A. I., Sprecher, B. S., Potok, M. A., Lyons, R. H., Jr., MacDougald, O. A., and Camper, S. A. (2001). Identification of members of the Wnt signaling pathway in the embryonic pituitary gland. *Mamm Genome* **12**, 843-51.
- Driscoll, D. A., Spinner, N. B., Budarf, M. L., McDonald-McGinn, D. M., Zackai, E. H., Goldberg, R. B., Shprintzen, R. J., Saal, H. M., Zonana, J., Jones, M. C., and et al. (1992). Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet* **44**, 261-8.
- Duncan, P. A., Shapiro, L. R., Stangel, J. J., Klein, R. M., and Addonizio, J. C. (1979). The MURCS association: Mullerian duct aplasia, renal aplasia, and cervicothoracic somite dysplasia. *J Pediatr* **95**, 399-402.
- Dunne, J., Hanby, A. M., Poulson, R., Jones, T. A., Sheer, D., Chin, W. G., Da, S. M., Zhao, Q., Beverley, P. C., and Owen, M. J. (1995). Molecular cloning and tissue expression of FAT, the human homologue of the *Drosophila* fat gene that is located on chromosome 4q34-q35 and encodes a putative adhesion molecule. *Genomics* **30**, 207-23.
- Elizondo, L. I., Jafar-Nejad, P., Clewing, J. M., and Boerkoel, C. F. (2009). Gene clusters, molecular evolution and disease: a speculation. *Curr Genomics* **10**, 64-75.
- Fagotto, F., Jho, E., Zeng, L., Kurth, T., Joos, T., Kaufmann, C., and Costantini, F. (1999). Domains of axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization. *J Cell Biol* **145**, 741-56.
- Ferreira, A. C., Mauad Filho, F., Nicolau, L. G., Gallareta, F. M., W.P., M., and Gomes, D. C. (2007). Three-dimensional ultrasound in gynecology: uterine malformations. *Radiol Bras* **40**, 131-136.
- Feuk, L., Carson, A. R., and Scherer, S. W. (2006). Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* **7**, 85-97.
- Folch, M., Pigem, I., and Konje, J. C. (2000). Mullerian agenesis: etiology, diagnosis, and management. *Obstet Gynecol Surv* **55**, 644-9.
- Fraser, I. S., Baird, D. T., Hobson, B. M., Michie, E. A., and Hunter, W. (1973). Cyclical ovarian function in women with congenital absence of the uterus and vagina. *J Clin Endocrinol Metab* **36**, 634-7.
- Gendron, R. L., Paradis, H., Hsieh-Li, H. M., Lee, D. W., Potter, S. S., and Markoff, E. (1997). Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice. *Biol Reprod* **56**, 1097-105.

- Gleason, J. E., Korswagen, H. C., and Eisenmann, D. M. (2002). Activation of Wnt signaling bypasses the requirement for RTK/Ras signaling during *C. elegans* vulval induction. *Genes Dev* **16**, 1281-90.
- Gonzalez, G., and Behringer, R. R. (2009). Dicer is required for female reproductive tract development and fertility in the mouse. *Mol Reprod Dev* **76**, 678-88.
- Greenberg, F., Courtney, K. B., Wessels, R. A., Huhta, J., Carpenter, R. J., Rich, D. C., and Ledbetter, D. H. (1988a). Prenatal diagnosis of deletion 17p13 associated with DiGeorge anomaly. *Am J Med Genet* **31**, 1-4.
- Greenberg, F., Elder, F. F., Haffner, P., Northrup, H., and Ledbetter, D. H. (1988b). Cytogenetic findings in a prospective series of patients with DiGeorge anomaly. *Am J Hum Genet* **43**, 605-11.
- Griffin, J. E., Edwards, C., Madden, J. D., Harrod, M. J., and Wilson, J. D. (1976). Congenital absence of the vagina. The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Ann Intern Med* **85**, 224-36.
- Grimbizis, G. F., Camus, M., Tarlatzis, B. C., Bontis, J. N., and Devroey, P. (2001). Clinical implications of uterine malformations and hysteroscopic treatment results. *Hum Reprod Update* **7**, 161-74.
- Hauser, G. A., and Schreiner, W. E. (1961). Das Mayer-Rokitansky-Küster-Syndrom. Uterus bipartitus solidus rudimentarius cum vagina solida. *Schweiz Med Wochschr* **91**, 381-384.
- Heikkila, M., Peltoketo, H., and Vainio, S. (2001). Wnts and the female reproductive system. *J Exp Zool* **290**, 616-23.
- Himmelfarb, M., Klopocki, E., Grube, S., Staub, E., Klamann, I., Hinzmann, B., Kristiansen, G., Rosenthal, A., Durst, M., and Dahl, E. (2004). ITIH5, a novel member of the inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family is downregulated in breast cancer. *Cancer Lett* **204**, 69-77.
- Hombria, J. C., and Lovegrove, B. (2003). Beyond homeosis--HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation* **71**, 461-76.
- Hong, X., Luense, L. J., McGinnis, L. K., Nothnick, W. B., and Christenson, L. K. (2008). Dicer1 is essential for female fertility and normal development of the female reproductive system. *Endocrinology* **149**, 6207-12.
- Hoppler, S., and Kavanagh, C. L. (2007). Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci* **120**, 385-93.
- Iafate, A. J., Feuk, L., Rivera, M. N., Listewnik, M. L., Donahoe, P. K., Qi, Y., Scherer, S. W., and Lee, C. (2004). Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* **36**, 949-51.
- Jones, H. W., Jr., and Mermut, S. (1972). Familial occurrence of congenital absence of the vagina. *Am J Obstet Gynecol* **114**, 1100-1.
- Jones, K. L. (1988). Rokitansky sequence. In "Smith's recognizable patterns of human malformations (Fourth ed.)" (W. B. Saunders, Ed.), pp. 570-1, Philadelphia.
- Kaufman, R. H., Binder, G. L., Gray, P. M., Jr., and Adam, E. (1977). Upper genital tract changes associated with exposure in utero to diethylstilbestrol. *Obstet Gynecol Surv* **32**, 611-3.
- Kazazian, H. H., Jr., and Goodier, J. L. (2002). LINE drive. retrotransposition and genome instability. *Cell* **110**, 277-80.
- Keller, R. (2002). Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* **298**, 1950-4.
- Kennell, J. A., O'Leary, E. E., Gummow, B. M., Hammer, G. D., and MacDougald, O. A. (2003). T-cell factor 4N (TCF-4N), a novel isoform of mouse TCF-4, synergizes with

- beta-catenin to coactivate C/EBPalpha and steroidogenic factor 1 transcription factors. *Mol Cell Biol* **23**, 5366-75.
- Kobayashi, A., and Behringer, R. R. (2003). Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat Rev Genet* **4**, 969-80.
- Kobayashi, A., Shawlot, W., Kania, A., and Behringer, R. R. (2004). Requirement of Lim1 for female reproductive tract development. *Development* **131**, 539-49.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J., and Clevers, H. (1998a). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* **19**, 379-83.
- Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Markman, M., Lamers, W., Destree, O., and Clevers, H. (1998b). Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol* **18**, 1248-56.
- Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R., and Moon, R. T. (2000). The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* **16**, 279-83.
- Küster, H. (1910). Uterus bipartitus solidus rudimentarius cum vagina solida. *Z Geb Gyn* **67**, 692-718.
- Lawrence, P. A., Struhl, G., and Casal, J. (2008). Planar cell polarity: A bridge too far? *Curr Biol* **18**, R959-61.
- Li, S., Qayyum, A., Coakley, F. V., and Hricak, H. (2000). Association of renal agenesis and mullerian duct anomalies. *J Comput Assist Tomogr* **24**, 829-34.
- Liang, P., and Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-71.
- Lichtner, P., Attie-Bitach, T., Schuffenhauer, S., Henwood, J., Bouvagnet, P., Scambler, P. J., Meitinger, T., and Vekemans, M. (2002). Expression and mutation analysis of BRUNOL3, a candidate gene for heart and thymus developmental defects associated with partial monosomy 10p. *J Mol Med* **80**, 431-42.
- Lichtner, P., König, R., Hasegawa, T., Van Esch, H., Meitinger, T., and Schuffenhauer, S. (2000). An HDR (hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia) syndrome locus maps distal to the DiGeorge syndrome region on 10p13/14. *J Med Genet* **37**, 33-7.
- Logan, C. Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 781-810.
- Maatouk, D. M., DiNapoli, L., Alvers, A., Parker, K. L., Taketo, M. M., and Capel, B. (2008). Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet* **17**, 2949-55.
- Maloof, J. N., and Kenyon, C. (1998). The Hox gene *lin-39* is required during *C. elegans* vulval induction to select the outcome of Ras signaling. *Development* **125**, 181-90.
- Mayer, C. A. J. (1829). Über Verdopplungen des Uterus und ihre Arten, nebst Bemerkungen über Hasenscharte und Wolfsrachen. *J Chir Auger* **13**, 525-564.
- Mendelsohn, C., Lohnes, D., Decimo, D., Lufkin, T., LeMeur, M., Chambon, P., and Mark, M. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* **120**, 2749-71.
- Moon, R. T., Kohn, A. D., De Ferrari, G. V., and Kaykas, A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* **5**, 691-701.
- Morcel, K., Camborieux, L., and Guerrier, D. (2007). Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome. *Orphanet J Rare Dis* **2**, 13.
- Mosimann, C., Hausmann, G., and Basler, K. (2009). Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 276-86.

- Nazwar, T. A., Glassmann, A., and Schilling, K. (2009). Expression and molecular diversity of Tcf712 in the developing murine cerebellum and brain. *J Neurosci Res* **87**, 1532-46.
- Nelson, W. J., and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**, 1483-7.
- Newbold, R. R. (2008). Prenatal exposure to diethylstilbestrol (DES). *Fertil Steril* **89**, e55-6.
- Newman, A. P., Acton, G. Z., Hartwig, E., Horvitz, H. R., and Sternberg, P. W. (1999). The lin-11 LIM domain transcription factor is necessary for morphogenesis of *C. elegans* uterine cells. *Development* **126**, 5319-26.
- Omer, C. A., Miller, P. J., Diehl, R. E., and Kral, A. M. (1999). Identification of Tcf4 residues involved in high-affinity beta-catenin binding. *Biochem Biophys Res Commun* **256**, 584-90.
- Opitz, J. M. (1987). Vaginal atresia (von Mayer-Rokitansky-Kuster or MRK anomaly) in hereditary renal adysplasia (HRA). *Am J Med Genet* **26**, 873-6.
- Ozawa, M., Baribault, H., and Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *Embo J* **8**, 1711-7.
- Parr, B. A., and McMahon, A. P. (1998). Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature* **395**, 707-10.
- Pavanello Rde, C., Eigier, A., and Otto, P. A. (1988). Relationship between Mayer-Rokitansky-Kuster (MRK) anomaly and hereditary renal adysplasia (HRA). *Am J Med Genet* **29**, 845-9.
- Peifer, M., McCrean, P. D., Green, K. J., Wieschaus, E., and Gumbiner, B. M. (1992). The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the *Drosophila* segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol* **118**, 681-91.
- Resendes, B. L., Sohn, S. H., Stelling, J. R., Tineo, R., Davis, A. J., Gray, M. R., and Reindollar, R. H. (2001). Role for anti-Mullerian hormone in congenital absence of the uterus and vagina. *Am J Med Genet* **98**, 129-36.
- Rokitansky, K. (1838). Über die sogenannten Verdoppelungen des Uterus. *Med Jahrb Österr Staat* **26**, 39-77.
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destree, O., and Clevers, H. (1998). The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* **395**, 608-12.
- Salier, J. P., Rouet, P., Raguenez, G., and Daveau, M. (1996). The inter-alpha-inhibitor family: from structure to regulation. *Biochem J* **315 ( Pt 1)**, 1-9.
- Sarto, G. E. (1974). Cytogenetics of fifty patients with primary amenorrhea. *Am J Obstet Gynecol* **119**, 14-23.
- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., and Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* **30**, e57.
- Schuffenhauer, S., Seidel, H., Oechsler, H., Belohradsky, B., Bernsau, U., Murken, J., and Meitinger, T. (1995). DiGeorge syndrome and partial monosomy 10p: case report and review. *Ann Genet* **38**, 162-7.
- Sebat, J., Lakshmi, B., Troge, J., Alexander, J., Young, J., Lundin, P., Maner, S., Massa, H., Walker, M., Chi, M., Navin, N., Lucito, R., Healy, J., Hicks, J., Ye, K., Reiner, A., Gilliam, T. C., Trask, B., Patterson, N., Zetterberg, A., and Wigler, M. (2004). Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* **305**, 525-8.
- Shaikh, T. H., Kurahashi, H., Saitta, S. C., O'Hare, A. M., Hu, P., Roe, B. A., Driscoll, D. A., McDonald-McGinn, D. M., Zackai, E. H., Budarf, M. L., and Emanuel, B. S. (2000).

- Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet* **9**, 489-501.
- Shaikh, T. H., O'Connor, R. J., Pierpont, M. E., McGrath, J., Hacker, A. M., Nimmakayalu, M., Geiger, E., Emanuel, B. S., and Saitta, S. C. (2007). Low copy repeats mediate distal chromosome 22q11.2 deletions: sequence analysis predicts breakpoint mechanisms. *Genome Res* **17**, 482-91.
- Siepel, A., Bejerano, G., Pedersen, J. S., Hinrichs, A. S., Hou, M., Rosenbloom, K., Clawson, H., Spieth, J., Hillier, L. W., Richards, S., Weinstock, G. M., Wilson, R. K., Gibbs, R. A., Kent, W. J., Miller, W., and Haussler, D. (2005). Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res* **15**, 1034-50.
- Strutt, D. (2003). Frizzled signalling and cell polarisation in Drosophila and vertebrates. *Development* **130**, 4501-13.
- Sugnet, C. W., Srinivasan, K., Clark, T. A., O'Brien, G., Cline, M. S., Wang, H., Williams, A., Kulp, D., Blume, J. E., Haussler, D., and Ares, M., Jr. (2006). Unusual intron conservation near tissue-regulated exons found by splicing microarrays. *PLoS Comput Biol* **2**, e4.
- Suh, M. R., Lee, Y., Kim, J. Y., Kim, S. K., Moon, S. H., Lee, J. Y., Cha, K. Y., Chung, H. M., Yoon, H. S., Moon, S. Y., Kim, V. N., and Kim, K. S. (2004). Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* **270**, 488-98.
- Sundaram, U. T., McDonald-McGinn, D. M., Huff, D., Emanuel, B. S., Zackai, E. H., Driscoll, D. A., and Bodurtha, J. (2007). Primary amenorrhea and absent uterus in the 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*.
- Takemaru, K. I., and Moon, R. T. (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J Cell Biol* **149**, 249-54.
- Tanoue, T., and Takeichi, M. (2005). New insights into Fat cadherins. *J Cell Sci* **118**, 2347-53.
- Teixeira, J., Kehas, D. J., Antun, R., and Donahoe, P. K. (1999). Transcriptional regulation of the rat Mullerian inhibiting substance type II receptor in rodent Leydig cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13831-8.
- Thomas, J. A., and Graham, J. M., Jr. (1997). Chromosomes 22q11 deletion syndrome: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr (Phila)* **36**, 253-66.
- Tiker, F., Yildirim, S. V., Barutcu, O., and Bagis, T. (2000). Familial mullerian agenesis. *Turk J Pediatr* **42**, 322-4.
- Torres, M., Gomez-Pardo, E., Dressler, G. R., and Gruss, P. (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development* **121**, 4057-65.
- Tsai, C. H., Van Dyke, D. L., and Feldman, G. L. (1999). Child with velocardiofacial syndrome and del (4)(q34.2): another critical region associated with a velocardiofacial syndrome-like phenotype. *Am J Med Genet* **82**, 336-9.
- Uliana, V., Giordano, N., Caselli, R., Papa, F. T., Ariani, F., Marcocci, C., Gianetti, E., Martini, G., Papakostas, P., Rollo, F., Meloni, I., Mari, F., Priolo, M., Renieri, A., and Nuti, R. (2008). Expanding the phenotype of 22q11 deletion syndrome: the MURCS association. *Clin Dysmorphol* **17**, 13-7.
- van Amerongen, R., and Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* **136**, 3205-14.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R., and Clevers, H. (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* **111**, 241-50.

- Van Esch, H., Groenen, P., Nesbit, M. A., Schuffenhauer, S., Lichtner, P., Vanderlinden, G., Harding, B., Beetz, R., Bilous, R. W., Holdaway, I., Shaw, N. J., Fryns, J. P., Van de Ven, W., Thakker, R. V., and Devriendt, K. (2000). GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. *Nature* **406**, 419-22.
- van Lingen, B. L., Reindollar, R. H., Davis, A. J., and Gray, M. R. (1998a). Further evidence that the WT1 gene does not have a role in the development of the derivatives of the mullerian duct. *Am J Obstet Gynecol* **179**, 597-603.
- van Lingen, B. L., Reindollar, R. H., Davis, A. J., and Gray, M. R. (1998b). Molecular genetic analysis of the PAX2 gene in patients with congenital absence of the uterus and vagina. *Fertil Steril* **70**, S402 (abstract).
- Veeck, J., Chorovicer, M., Naami, A., Breuer, E., Zafrakas, M., Bektas, N., Durst, M., Kristiansen, G., Wild, P. J., Hartmann, A., Knuechel, R., and Dahl, E. (2008). The extracellular matrix protein ITIH5 is a novel prognostic marker in invasive node-negative breast cancer and its aberrant expression is caused by promoter hypermethylation. *Oncogene* **27**, 865-76.
- Veeman, M. T., Axelrod, J. D., and Moon, R. T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* **5**, 367-77.
- Vigier, B., Tran, D., Legeai, L., Bezdard, J., and Josso, N. (1984). Origin of anti-Mullerian hormone in bovine freemartin fetuses. *J Reprod Fertil* **70**, 473-9.
- Vigier, B., Watrin, F., Magre, S., Tran, D., and Josso, N. (1987). Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. *Development* **100**, 43-55.
- Wallingford, J. B., and Habas, R. (2005). The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* **132**, 4421-36.
- Warot, X., Fromental-Ramain, C., Fraulob, V., Chambon, P., and Dolle, P. (1997). Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts. *Development* **124**, 4781-91.
- Weidinger, G., and Moon, R. T. (2003). When Wnts antagonize Wnts. *J Cell Biol* **162**, 753-5.
- Wulfsberg, E. A., and Grigbsy, T. M. (1990). Rokitansky sequence in association with the facio-auriculo-vertebral sequence: part of a mesodermal malformation spectrum? *Am J Med Genet* **37**, 100-2.
- Yamaguchi, T. P., Bradley, A., McMahon, A. P., and Jones, S. (1999). A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* **126**, 1211-23.
- Ye, F., Chen, Y., Hoang, T., Montgomery, R. L., Zhao, X. H., Bu, H., Hu, T., Taketo, M. M., van Es, J. H., Clevers, H., Hsieh, J., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., and Lu, Q. R. (2009). HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat Neurosci* **12**, 829-38.
- Yin, Y., Lin, C., and Ma, L. (2006). MSX2 promotes vaginal epithelial differentiation and wolffian duct regression and dampens the vaginal response to diethylstilbestrol. *Mol Endocrinol* **20**, 1535-46.
- Zhan, Y., Fujino, A., MacLaughlin, D. T., Manganaro, T. F., Szotek, P. P., Arango, N. A., Teixeira, J., and Donahoe, P. K. (2006). Mullerian inhibiting substance regulates its receptor/SMAD signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Mullerian duct regression. *Development* **133**, 2359-69.
- Zhuo, L., Yoneda, M., Zhao, M., Yingsung, W., Yoshida, N., Kitagawa, Y., Kawamura, K., Suzuki, T., and Kimata, K. (2001). Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility. A study by inactivation of the bikunin gene in mice. *J Biol Chem* **276**, 7693-6.

# Abréviations



## ABBREVIATIONS

aCGH	array Comparative Genomic Hybridization
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADNg	Acide DésoxyriboNucléique génomique
AMH	Anti-Müllerian Hormone
ARN(m)	Acide RiboNucléique (messenger)
BCBD	Beta-Catenin Binding Domain
BET	Bromure d'ETHidium
BRA	Bilateral Renal Agenesis
BSA	Bovine Serum Albumin
CHX	CycloHeXimide
Da	Dalton
DDRT-PCR	Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
DGCR2	DiGeorge Critical Region 2
DGS	DiGeorge Syndrome
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
dNTP	désoxyribiNucléotide Tri-Phosphate
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
FISH	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
HDR	Hypoparathyroïdism Deafness Renal dysplasia syndrome
HRA	Hereditary Renal Adysplasia
HIS	Hybridation <i>in situ</i>
HMG	High-mobility Group box
HRA	Hereditary Renal Adysplasia
ITIH5	Inter- $\alpha$ -Trypsin Inhibitor Heavy chain precursor 5
<i>jpc</i>	jour(s) <i>post-coïtum</i>
<i>jpp</i>	jour(s) <i>post-partum</i>
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
Mb	Mégabase
min	minute
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MRKH	Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (Syndrome de)
MURCS	MÜllerian duct aplasia, unilateral Renal aplasia, and Cervicothoracic Somite dysplasia
NLS	Nuclear Localization Signal
NMD	Nonsense-Mediated Decay
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
ORF	Open Reading Frame
pb	paire(s) de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBT	Phosphate Buffer Saline-Tween 20
PCR(q)	Polymerase Chain Reaction (quantitative)
PRAM	Programme de Recherche sur les Aplasies Müllériennes
Puro	Puromycine
QMPSF	Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent fragments

RT-PCR	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
RT-PCRq	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction quantitative
Tcf712	T-cell-specific transcription factor 7-like 2
Tcf/Lef	T-cell-specific transcription factor/Lymphoid enhancer binding factor
TBE	Tris-acide Borique-EDTA
TE	Tris-EDTA
URA	Unilateral Renal Agenesis
UTR	UnTranslated Region
V	Volt
Wnt	Wingless and Int-1

La dénomination des gènes est celle recommandée par le HGNC (HUGO gene nomenclature committee) disponible sur le site [www.genenames.org/](http://www.genenames.org/).

## RESUME

La mise en place et la différenciation du tractus génital femelle est un processus développemental complexe. Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans ce processus sont régis par de nombreux gènes et voies de signalisation, entre lesquels les interactions sont multiples. Leur connaissance précise est d'une grande importance d'un point de vue clinique pour la compréhension des mécanismes pathogéniques à l'origine de malformations congénitales. Inversement, l'étude génétique des syndromes malformatifs affectant le tractus reproducteur féminin contribue à la définition des cascades génétiques régulant la mise en place de cet organe essentiel. Dans ce cadre, deux axes de recherche, l'un fondamental, l'autre clinique, ont été suivis dans cette étude.

Dans la première approche, le rôle du gène *mTcf712* a été étudié au cours du développement des voies génitales internes mâle et femelle chez la souris. Ce gène, codant pour un co-facteur transcriptionnel de la voie de signalisation Wnt, est soumis à de nombreux événements d'épissage alternatif menant à la synthèse de plusieurs isoformes protéiques. La caractérisation de son expression dans les canaux de Müller (ébauches embryonnaires des voies génitales internes femelles) en cours de différenciation indique qu'il pourrait être impliqué dans la régulation transcriptionnelle de gènes cibles lors de ce processus. L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude suggère que les produits du gène *mTcf712* participent au développement sexuellement dimorphique du tractus génital interne.

La seconde partie concerne une étude génétique menée sur une cohorte de patientes atteintes du syndrome d'aplasie utéro-vaginale congénitale, dit syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH). Cette étude nous a conduits à caractériser, chez quatre patientes non apparentées, quatre microdélétions au sein des régions critiques du syndrome de DiGeorge, une pathologie malformative congénitale dont le spectre de malformations chevauche celui du syndrome MRKH. La question d'une seule et même entité clinique aux manifestations phénotypiques très variables, ou d'un syndrome dit de gènes contigus selon les cas, peut se poser. La délimitation précise de l'une de ces microdélétions a abouti à la définition d'un gène candidat, *ITIH5*, dont les études préliminaires de profil d'expression chez la souris suggèrent qu'il joue un rôle très important lors du processus de différenciation des canaux müllériens.