



**HAL**  
open science

# Étude des gènes impliqués dans le déterminisme gonadique chez l'homme

Capucine Hyon

► **To cite this version:**

Capucine Hyon. Étude des gènes impliqués dans le déterminisme gonadique chez l'homme. Génétique humaine. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066493 . tel-01539508

**HAL Id: tel-01539508**

**<https://theses.hal.science/tel-01539508>**

Submitted on 15 Jun 2017

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

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

# Université Pierre et Marie Curie

ED515 – Complexité du vivant

*UMRS 933 : Physiopathologie des maladies génétiques d'expression pédiatrique*

## **Étude des gènes impliqués dans le déterminisme gonadique chez l'Homme**

**Par Capucine Hyon**

Thèse de doctorat de Génétique Humaine

Dirigée par Jean-Pierre Siffroi

Présentée

et soutenue publiquement le 13 décembre 2016

Devant un jury composé de :

Benzacken Brigitte	PU-PH	Université Paris 13	Rapporteur
Dupont Jean-Michel	PU-PH	Université Paris Descartes	Rapporteur
Lévy Rachel	PU-PH	UPMC	Examineur
Plotton Ingrid	MCU-PH	Université Lyon 1	Examineur
McElreavey Kenneth	DR	Institut Pasteur	Examineur
Christin-Maître Sophie	PU-PH	UPMC	Examineur
Siffroi Jean-Pierre	PU-PH	UPMC	Directeur de thèse



Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction du Professeur Jean-Pierre Siffroi, au sein de l'unité mixte de recherche Inserm / UPMC UMR\_S933 dirigée par le Professeur Serge Amselem.

Adresse : Département de Génétique Médicale, Hôpital Armand Trousseau ; 26 avenue du Docteur Arnold Netter, 75012, Paris.



*Dédicace*

*A Léon et Mathurin*

## **Remerciements**

Je remercie sincèrement l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie en particulier Brigitte Benzacken et Jean-Michel Dupont d'avoir accepté cette lourde tâche d'être rapporteur de ces travaux.

Je remercie également Ken McElreavey qui a accepté de faire partie de mon comité de thèse puis de ce jury (en Français!). Tu m'as également accueilli dans ton laboratoire pour une année écourtée mais où j'ai pu découvrir et apprendre des nouvelles techniques et travailler avec Anu Bashamboo et Caroline. Merci encore pour ton accueil et les échanges que nous avons.

Je remercie Sophie Christin-Maître qui a non seulement accepté de faire partie de ce jury mais qui m'a également beaucoup aidé pour ce travail. En effet, sans ton aide une grande partie de ce travail n'aurait pas été possible. Merci encore.

Je remercie les autres membres du jury qui me font l'honneur d'avoir accepté d'y participer : Rachel Lévy et Ingrid Plotton.

Enfin je remercie Jean-Pierre Siffroi, mon directeur de thèse et chef de service. Merci à vous de m'avoir accueilli il y a maintenant six ans et de m'avoir fait découvrir cette thématique de l'infertilité et des anomalies du développement sexuel. Merci pour votre disponibilité et votre écoute, et toute l'aide que vous m'avez apporté pour ce travail. Je tiens sincèrement à vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi et vous dire toute ma reconnaissance.

Je tiens ensuite à remercier tous ceux qui ont aidé à la réussite de ce travail et sans qui cela n'aurait pas été possible.

Merci à Serge Amselem pour son accueil dans son unité, la thématique des anomalies du développement sexuel est jeune mais pleine d'avenir!

## *Remerciements*

---

Merci Lamisse pour ton aide pendant mon absence. Tu as repris la thématique et tu l'as faites avancer. Merci beaucoup d'avoir fait les manips de QMPSF. J'espère qu'on se recroisera bientôt.

Merci à l'ensemble des techniciens "du rez-de-chaussée" et en particulier Nathalie et Sylvie qui m'aidez sur cette thématique des DSD.

Merci "la BM" ! Merci à vous Françoise et Fabienne pour la réalisation des puces. Sans vous ce travail n'aurait pas été possible. Merci également pour votre disponibilité et votre gentillesse à chaque fois que je vous sollicite !

Merci à toi Sandra. Je ne sais pas comment je pourrai te remercier d'avoir pris le relais pour que je puisse terminer ce manuscrit. Merci également pour tout le travail que tu as fait sur les IOP. Merci également pour ta bonne humeur toujours présente et tes pastilles à la menthe quand je viens m'asseoir dans ton "fauteuil"! Merci sincèrement.

Merci également à l'ensemble des membres du service, les techniciennes et les médecins, toujours disponibles pour un coup de main ou un conseil. Merci également pour votre gentillesse et votre bonne humeur.

Merci Eva, tu m'as sauvé sur le fil, grâce à toi mes données sont complètes ! Merci également pour ta bonne humeur et ton soutien !

Merci Christel pour tes conseils avisés sur le NGS, tu es partie à Strasbourg mais les emails fonctionnent bien ! ;)

Merci aux cliniciens qui nous ont adressé les échantillons des patients, en particulier Bruno Donadille à Saint-Antoine qui m'a donné toutes les informations sur la cohorte d'IOP. Merci beaucoup pour ton aide. Merci également aux cliniciens des hôpitaux de la Pitié Salpêtrière, Tenon mais également Angers, Montpellier et Poitiers.

Merci aux patients sans qui tous ces travaux ne seraient pas possible.

Merci à tous ceux que j'ai rencontré sur la route des études de médecine et de la recherche et qui m'ont mené jusque-là.

Merci Marie et Nathalie, vous étiez les premières que j'ai rencontrées pendant mon internat. Vous m'avez fait apprécier la biologie médicale (et pourtant c'était de la biochimie ;) ) et 10 ans après c'est toujours avec une grande joie que je vous retrouve.

Merci à Serge et Valérie, vous m'avez fait découvrir la cytogénétique et sans vous je n'en serai pas là aujourd'hui.

Merci à toi Matthieu pour tout. Merci pour ton aide, ta disponibilité et surtout ton écoute. Le prochain sur la liste des PhD c'est toi. On va y arriver !

Merci à Alex mon colocataire à mi-temps pour tes conseils. J'apprécie beaucoup nos moments de détente quand tu passes au labo!

Merci à Caroline pour tout ce que tu m'as montré et appris lors de mon passage à Pasteur. C'est toujours un immense plaisir de passer te voir et discuter boulot mais pas uniquement !

Merci également à Joëlle et ses petites astuces pour améliorer les PCR !

Merci aux copains "médecins", cela fait maintenant presque 20 ans qu'on se connaît et vous êtes toujours là : Chacha, Mim's, Martin et les autres...

Merci aux copains "école", ça fait pas 20 ans mais on dirait presque, heureusement que vous êtes là parce que je n'aurai pas pu terminer ce travail sans vous : Julie, Belka, Solenne, Christophe...

Merci aux autres copains qui prennent des nouvelles de ce travail, à votre manière vous m'avez également aidé.

Merci à ma famille de m'avoir guidé jusque-là.

Et enfin, merci à toi Thomas, je n'aurai pas pu faire tout cela sans toi.



## Glossaire

°C : degré celsius

5-FAM : 5-Carboxyfluorescein

AA : Apparenté Atteint

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AHC : Adrenal Hypoplasia Congenita

AKT : AKT serine/threonine kinase

AMH : Anti Mullerian Hormone

AMHR2 : anti-Müllerian hormone receptor type 2

ANA : Apparenté Non Atteint

AR : androgen receptor

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARX : aristaless related homeobox

ATRX : ATRX, chromatin remodeler

AXIN2 : axin 2

BAF : B Allele Frequency

BAM : Binary Alignment/Map

BAX : BCL2 associated X, apoptosis regulator

BCL2 : BCL2, apoptosis regulator

BCLX : BCL2 like 1

bHLH : basic helix-loop-helix

BMP15 : bone morphogenetic protein 15

BMPs : Bone Morphogenic Proteins

BPES : Blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus

C10orf2 : twinkle mtDNA helicase

CASP3 : caspase 3

CBX2 : Chromobox homolog 2

CGD : Complete Gonadal Dysgenesis

CGH array : Comparative Genomic Hybridization array

CI : Cas Index

CLPP : caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit

CNP : Copy Number Polymorphisms

CNV : Copy Number Variations  
CPEB1 : cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1  
CREB : cAMP-response element-binding protein  
CTNNB1 : catenin beta 1  
CYP19A1 : cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1  
CYP26B1 : cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1  
DAX1 : Dosage sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region, X chromosome gene 1  
DECIPHER : Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources  
DGV : Database of Genomic Variants  
DHCR7 : 7-dehydrocholesterol reductase  
DHH : desert hedgehog  
DHT : dihydrotestostérone  
DIAPH2 : diaphanous-related formin 2  
DMD : dystrophin  
DMRT1 : dsx- and mab3 related transcription factor 1  
DMY : DMY protein  
dpc : day post coitum  
DSD : Disorders of Sex Development  
DSS : Dosage Sensitive Sex reversal  
EMX2 : empty spiracles homeobox 2  
ERK1/2 : mitogen-activated protein kinase 3/mitogen-activated protein kinase 1  
FGF9 : fibroblast growth factor 9  
FGFR2 : fibroblast growth factor receptor 2  
FIGLA : folliculogenesis specific bHLH transcription factor  
FISH : Fluorescent In Situ Hybridization  
FMR1 : fragile X mental retardation 1  
FOXL2 : forkhead box L2  
FOXO1 : forkhead box O1  
FOXO3A : forkhead box O3A  
FRAT1 : frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1  
FSH : follicle stimulating hormone

FSHR : follicle stimulating hormone receptor  
FST : follistatin  
FXTAS : Fragile X Tremor and Ataxia Syndrome  
FZ : Frizzled  
Gadd45 $\gamma$  : growth arrest and DNA damage inducible gamma  
GALT : galactose-1-phosphate uridylyltransferase  
GALT : galactose-1-phosphate uridylyltransferase  
GATA4 : GATA binding protein 4  
GDF9 : growth differentiation factor 9  
GFAP : glial fibrillary acidic protein  
GKD : Glycerol Kinase Deficiency  
GPR3 : G protein-coupled receptor 3  
HARS2 : histidyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial  
HSD17B4 : hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 4  
IOP : Insuffisance Ovarienne Prématurée  
Jmjd1a : lysine demethylase 3A  
KO : knock out  
LARS2 : leucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial  
LCRs : Low Copy Repeats  
LGR5 : leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5  
LH : luteinizing hormone  
LHR : luteinizing hormone receptor  
LHX8 : LIM homeobox 8  
LHX9 : LIM homeobox 9  
LRP6 : low density lipoprotein receptor-related protein 6  
MAP3K1 : mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1  
Map3k4 : mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4  
miRNA : microRNA  
MKK4 : mitogen-activated protein kinase kinase 4  
NAHR : Non Allelic Homologous Recombination  
NGS : Next Generation Sequencing  
NOBOX : NOBOX oogenesis homeobox  
NR0B1 : nuclear receptor subfamily 0 group B, member 1

NR5A1 : nuclear receptor subfamily 5 group A member 1  
OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man  
ORF : Open Reading Frame  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PGC : Primordial Germ Cells  
PGD : Partial Gonadal Dysgenesis  
PGD(2) : prostaglandine D(2)  
PGRMC1 : progesterone receptor membrane component 1  
PI3K : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase  
POF1 : premature ovarian failure 1  
POF1B : premature ovarian failure, 1B  
POF2 : premature ovarian failure 2  
POU5F1 : POU class 5 homeobox 1  
PTCH1 : patched 1  
PTEN : phosphatase and tensin homolog  
PTGDS : prostaglandin D2 synthase  
QMPSF : Quantitative Multiplex PCR of short fluorescent fragments  
RAOH : ras homolog family member A  
ROH : Region of Homozygosity  
RSPO1 : R-spondin 1  
RSPO2 : R-spondin 2  
SERKAL : SEx Reversion, Kidneys, Adrenal and Lung dysgenesis  
SF1 : Steroidogenic factor 1  
SIX1 : SIX homeobox 1  
SIX4 : SIX homeobox 4  
SNP array : Single Nucleotide Polymorphism array  
SNVs : Single Nucleotide Variations  
SOHLH1 : spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1  
SOHLH2 : spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2  
SOX : SRY-related high-mobility group (HMG) box  
SOX10 : SRY-box 10  
SOX3 : SRY-box 3  
SOX8 : SRY-box 8

SRD5A2 : 5-alpha réductase  
SRY : sex determining region Y  
Stra8 : stimulated by retinoic acid 8  
SYCP1 : synaptonemal complex protein 1  
TDF : Testis-Determining Factor  
Tesco : testis-specific core element  
TGF $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$   
WGS : whole genome sequencing  
WNT : Wnt family member 4  
WT : Wild Type  
WT1 : wilms tumor 1  
XPNPEP2 : X-prolyl aminopeptidase 2  
ZFPM2 : zinc finger protein, FOG family member 2  
ZFY : zinc finger protein Y



# Sommaire

Remerciements .....	1
Glossaire.....	5
Sommaire .....	11
I. Introduction .....	15
A. Développement sexuel .....	15
1. Le développement de la gonade .....	15
a) La gonade indifférenciée ou bi-potentielle.....	16
b) Le développement testiculaire.....	18
c) Le développement ovarien .....	18
2. Le développement des voies génitales et des organes génitaux externes .....	19
a) Le stade indifférencié .....	19
b) La différenciation masculine .....	22
c) La différenciation féminine .....	23
B. Facteurs génétiques impliqués dans le développement gonadique .....	24
1. La gonade bi-potentielle.....	24
a) <i>WT1</i> .....	24
b) <i>NR5A1</i> .....	25
c) <i>Emx2</i> .....	26
d) <i>Lhx9</i> .....	26
e) <i>CBX2</i> .....	27
f) <i>GATA4</i> .....	27
2. Le développement testiculaire.....	29
a) <i>SRY</i> .....	29
b) <i>SOX9</i> .....	32
c) Autres gènes <i>SOX</i> .....	34
d) <i>NROB1</i> .....	36
e) <i>DHH</i> .....	38
f) <i>DMRT1</i> .....	38
3. Le développement ovarien .....	41
a) La voie de signalisation canonique <i>WNT/β-catenine</i> .....	41
b) <i>WNT4</i> .....	43
c) <i>RSPO1</i> .....	44
d) <i>FOXL2</i> .....	44
e) <i>FST</i> .....	45
C. Anomalies du développement sexuel.....	47
1. DSD 46,XY : anomalie du déterminisme testiculaire .....	49
2. DSD 46,XX : anomalie du déterminisme ovarien.....	52
D. Développement folliculaire .....	55
1. Les follicules primordiaux .....	55
2. Le développement folliculaire.....	55
E. Facteurs génétiques de la folliculogénèse .....	57
1. Formation des follicules primordiaux .....	57
a) Voies de signalisations Notch et Kitl/Kit.....	57
b) <i>SOHLH1</i> et <i>SOHLH2</i> .....	58
c) <i>FIGLA</i> .....	58

d) <i>NOBOX</i> .....	59
e) <i>FOXL2</i> .....	60
f) Acide rétinoïque .....	60
2. Régulation du pool de follicules primordiaux .....	61
3. Croissance folliculaire.....	61
a) Famille du TGF- $\beta$ : <i>GDF9</i> et <i>BMP15</i> .....	61
b) Voie de signalisation PI3K.....	62
c) <i>LHX8</i> .....	63
4. Croissance folliculaire hormonodépendante .....	65
F. Insuffisance Ovarienne Précoce .....	65
1. Définition .....	65
2. Anomalies chromosomiques impliquées dans les IOP .....	66
3. IOP syndromiques .....	68
Syndrome BPES .....	68
Galactosémie .....	69
Syndrome de Perrault .....	69
4. Gènes impliqués dans les IOP non syndromiques .....	70
<i>FMRI</i> .....	70
<i>NR5A1</i> .....	71
II. Objectifs de l'étude .....	73
III. Matériels et méthodes.....	75
A. Patients .....	75
1. Cohortes de patients DSD .....	75
a) Cohorte DSD 46,XX testiculaire ou ovotesticulaire .....	75
b) Cohorte DSD 46,XY avec CGD et DSD 46,XX testiculaire ou ovotesticulaire..	75
2. Cohorte de patientes ayant une IOP .....	75
B. Etude génétique pangénomique .....	76
1. CGH array .....	76
2. SNP array .....	77
3. Interprétation des données.....	78
C. Etude génétique ciblée .....	79
1. Séquençage Sanger.....	79
2. Long-range PCR.....	82
3. QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of short fluorescent fragments).....	84
4. PCR quantitative .....	86
D. Etude d'exome.....	88
E. Outils bioinformatiques.....	89
IV. Résultats et discussion.....	91
A. Partie I : Recherche de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans le développement testiculaire .....	91
1. Etude de la région <i>RevSex</i> en amont de <i>SOX9</i> .....	91
a) Redéfinition de la région minimale critique <i>RevSex</i> en amont de <i>SOX9</i> (Article 1)	91
b) Etude de la région <i>RevSex</i> dans la cohorte DSD 46,XY et DSD 46,XX .....	93
Caractéristiques de la cohorte .....	93
Résultats de qPCR.....	95
c) Discussion .....	96
2. Cohorte DSD 46,XX .....	98
a) Caractéristiques de la cohorte .....	98
b) Résultats .....	100

---

c) Discussion .....	103
B. Partie II : Recherche de nouveaux gènes impliqués dans l'IOP .....	108
1. Étude du gène CPEB1 (Article 2) .....	108
a) <i>CPEB1</i> .....	109
b) Séquençage du gène <i>CPEB1</i> .....	110
c) QMPSF .....	111
d) Délétion de <i>CPEB1</i> dans un cas familial d'IOP .....	112
e) Discussion .....	113
2. Cohorte FAMIOP (données non publiées).....	114
a) Résultats de l'étude SNP .....	114
Délétion 15q25 .....	115
Délétion 4q35 .....	115
Autres CNV .....	115
Régions de ROH.....	116
b) Discussion .....	119
Conclusion.....	121
Bibliographie.....	123
Annexes .....	141
Annexe 1 .....	142
Table des illustrations .....	147
Table des tableaux.....	149
Article 1 : Refining the Regulatory Region Upstream of <i>SOX9</i> Associated With 46,XX Testicular Disorders of SexDevelopment (DSD).....	151
Article 2 : Deletion of <i>CPEB1</i> Gene: A Rare but Recurrent Cause of Premature Ovarian Insufficiency.....	161



# **I. Introduction**

Une question souvent posée par l'entourage d'un couple après quelques années de vie commune est : « alors quand est-ce que vous faites un petit ? ». Cette question souvent anodine peut parfois conduire à une situation difficile pour le couple si celui-ci est infertile. Cette infertilité peut avoir des origines diverses : toxiques, environnementales, traumatiques ou génétiques. Dans certains cas, l'exploration de l'infertilité d'un couple peut mener à la découverte d'une anomalie du développement de la gonade chez l'un ou l'autre, on parle alors de DSD pour « Disorders of Sex Development », ou bien à la mise en évidence d'une insuffisance ovarienne prématurée (IOP) chez la femme.

## **A. Développement sexuel**

L'embryon humain est issu de la fécondation du gamète maternel, l'ovocyte, par le gamète paternel, le spermatozoïde. Lors de la formation de cet embryon s'établit ce qu'on nomme le sexe génétique. En effet, les gamètes parentaux contiennent le matériel génétique du futur embryon. Si l'œuf est constitué de deux chromosomes X, l'embryon sera de sexe génétique féminin, en revanche, s'il est constitué d'un chromosome X et d'un chromosome Y, ce sera un embryon de sexe génétique masculin. Le contenu chromosomique de l'œuf va déterminer la différenciation des gonades. Habituellement, les embryons de sexe génétique féminin XX, ont un développement ovarien tandis que les embryons de sexe génétique masculin, ont un développement testiculaire. On parle alors de sexe gonadique. Enfin, lorsque la gonade est fonctionnelle, celle-ci permet le développement des voies génitales et des organes génitaux externes féminin ou masculin, on parle de sexe phénotypique correspondant au sexe identifié cliniquement.

### **1. Le développement de la gonade**

Le développement de la gonade est la première étape de la mise en place de l'appareil génital. Il commence très précocement, dès la 3<sup>ème</sup> semaine de développement chez l'humain, par la mise en place d'une structure indifférenciée identique chez les embryons XX et XY.

**a) La gonade indifférenciée ou bi-potentielle**

Deux populations cellulaires distinctes interviennent dans la mise en place de la gonade bi-potentielle : les cellules germinales primordiales (PGCs) qui seront à l'origine des gamètes et les cellules somatiques de soutien.

Le développement des crêtes génitales, support des futures gonades, se fait en étroite association avec le système urinaire et surrénalien. En effet, à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine de développement, les crêtes génitales vont se former entre le mésonéphros et la racine du mésentère dorsal par prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique mais également par prolifération des cellules mésenchymateuses sous-jacentes (Encha-Razavi and Escudier, 2008).

Par ailleurs, les PGCs apparaissent dès le 10<sup>ème</sup> - 11<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire au niveau de l'épiblaste puis celles-ci vont migrer en région extra embryonnaire, dans la paroi postérieure de la vésicule vitelline près de l'allantoïde (De Felici, 2013). Entre la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> semaine, ces PGCs vont proliférer passant de quelques dizaines à plusieurs centaines avant de migrer à nouveau au cours de la 5<sup>ème</sup> et de la 6<sup>ème</sup> semaine de développement vers les crêtes génitales en passant le long de la paroi du tube digestif postérieur puis à travers le mésentère dorsal pour enfin atteindre les crêtes génitales. Pendant cette migration, les PGCs continuent à se multiplier.

L'arrivée des PGCs au niveau des crêtes génitales entraîne la prolifération des cellules épithéliales cœlomiques en profondeur qui vont pouvoir entourer les cellules germinales et former ainsi les cordons sexuels primitifs. A ce stade, la gonade a une morphologie strictement identique dans les deux sexes avec la présence des cordons sexuels primitifs aussi bien dans la région corticale que dans la région médullaire (Figure 1).

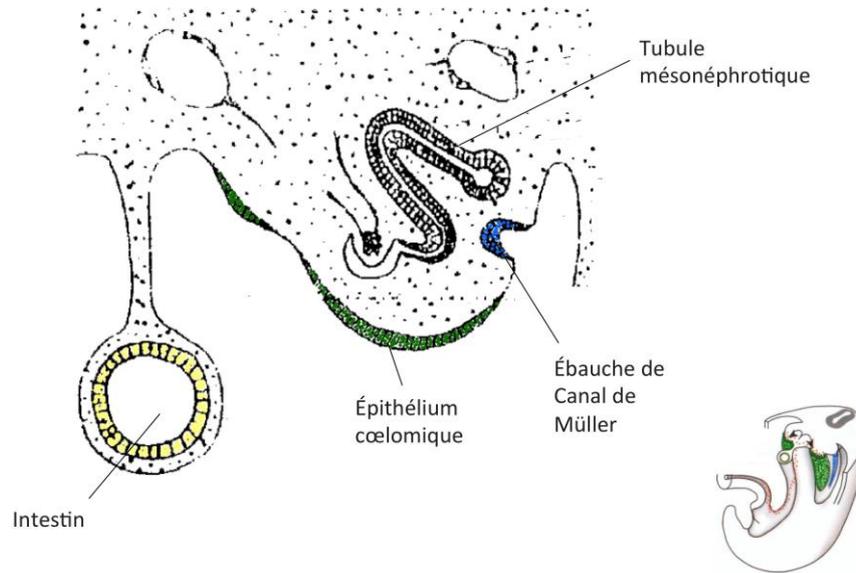
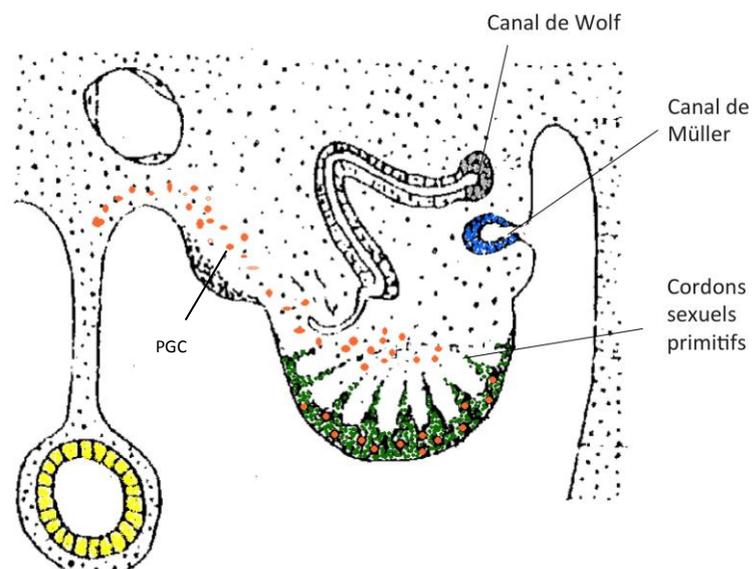
5<sup>ème</sup> semaine de développementFin de la 6<sup>ème</sup> semaine de développement

Figure 1. Schémas d'une coupe transversale d'embryon au niveau de la région du mésonéphros lors du développement de la gonade bi-potentielle au cours de la 5<sup>ème</sup> semaine et à la fin de la 6<sup>ème</sup> semaine de développement.

### **b) Le développement testiculaire**

Le développement testiculaire intervient précocement, dès la 7<sup>ème</sup> semaine de développement. Il commence par la différenciation des cellules somatiques de la gonade bipotentielle en cellules pré-Sertoliennes. Ces cellules vont alors se polariser et établir des jonctions intercellulaires conduisant à l'englobement des PGCs et à la formation des cordons séminifères (Wilhelm et al., 2007a).

Les autres types cellulaires présents dans le testicule fœtal proviennent à la fois de l'épithélium cœlomique et du mésonéphros. Les cellules dérivant de l'épithélium cœlomique vont principalement contribuer à l'augmentation du volume de la gonade tandis que les cellules issues du mésonéphros vont pour leur part contribuer à la mise en place de l'architecture gonadique (DeFalco et al., 2011; Karl and Capel, 1998). En effet, une migration de cellules endothéliales d'origine mésonéphrotique va entraîner la compartimentation de la gonade et donner naissance aux cordons testiculaires tout en structurant la vascularisation du testicule (Martineau et al., 1997).

Les cellules myoïdes périvitubulaires se différencient à partir de cellules provenant du mésonéphros. Avec les cellules de Sertoli, elles contribuent à la mise en place de la membrane basale qui entoure les cordons testiculaires.

Le dernier type cellulaire important présent dans l'interstitium correspond aux cellules de Leydig. Ces cellules sont responsables de la synthèse des stéroïdes gonadiques qui permettra la différenciation des voies génitales et des organes génitaux externes masculins. L'origine exacte de ces cellules n'est pas complètement établie. Elles se différencient à partir des cellules du mésenchyme qui ont probablement une origine double, certaines cellules provenant de l'épithélium cœlomique et d'autres de la région du mésonéphros. (DeFalco et al., 2011; Karl and Capel, 1998).

### **c) Le développement ovarien**

Le développement ovarien intervient plus tardivement que le développement testiculaire. Il débute à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine de développement avec la disparition des cordons sexuels situés en profondeur et l'apparition d'une deuxième génération de cordons sexuels qui prolifèrent à partir de l'épithélium de surface et entourent les PGCs qui continuent

à se multiplier. Vers 12 semaines de grossesse, on peut alors distinguer deux zones dans l'ovaire : la zone corticale contenant les cordons sexuels et la zone médullaire. Au cours du 4<sup>ème</sup> mois de grossesse, la progression des vaisseaux depuis la médullaire vers la corticale entraîne la fragmentation des cordons sexuels en amas cellulaires qui vont alors entourer plusieurs PGCs qui restent connectées entre elles par des ponts intercellulaire. Ces PGCs vont se transformer en ovogonies et continuer à proliférer de manière synchrone. Les ovogonies situées le plus en profondeur vont ensuite entrer spontanément en première division de méiose et former les ovocytes I. Ceux-ci stimulent alors les cellules de soutien qui les entourent entraînant leur différenciation en cellules folliculaires (ou cellules de la granulosa). Ces cellules forment une couche uni-stratifiée autour de l'ovocyte pour constituer un follicule primordial. Ce processus aboutissant à la formation des follicules primordiaux s'accompagne d'une perte massive d'ovocytes puisque seul un tiers des ovocytes vont former des follicules primordiaux (Pepling and Spradling, 2001). Les ovocytes restent ensuite bloqués en prophase de première division de méiose jusqu'à la puberté où ils reprendront leurs divisions. Le nombre maximal de follicules est atteint vers l'âge de 5 mois de grossesse avec environ 7 millions de follicules primordiaux. Cette réserve diminue fortement jusqu'à la naissance où le nombre de follicules restant est estimé entre 1 et 2 millions.

## **2. Le développement des voies génitales et des organes génitaux externes**

Le développement des voies génitales masculines et féminines est étroitement lié au développement rénal fœtal et à ses voies excrétrices.

### **a) Le stade indifférencié**

Jusqu'à la 7<sup>ème</sup> semaine de développement, les voies génitales sont sous forme indifférenciée dans les deux sexes avec la présence de deux paires de canaux.

Dès la 4<sup>ème</sup> semaine de développement, le futur canal de Wolff apparaît initialement au niveau de la partie antérieure du mésoderme intermédiaire sous la forme d'un cordon cellulaire plein. Ce cordon va ensuite progresser vers la partie caudale de l'embryon pour fusionner avec la paroi postérieure du cloaque (Mullen and Behringer, 2014). Lors de sa progression, il se tubulise pour former le canal de Wolff. Ce canal correspond initialement à la voie excrétrice du mésonéphros mais dès que le métanéphros devient fonctionnel,

l'ensemble du mésonéphros régresse sauf les quelques tubules situés en regard de l'ébauche gonadique qui vont permettre de relier la gonade au canal de Wolff.

A partir de la 6<sup>ème</sup> semaine une deuxième paire de canaux apparaît, ce sont les canaux de Müller. Ceux-ci se forment latéralement par rapport aux canaux de Wolff, par un mécanisme d'invagination en doigt de gant à partir d'un épaissement de l'épithélium cœlomique. L'invagination débute au niveau du 3<sup>ème</sup> somite thoracique et progresse caudalement jusqu'à la paroi postérieure du sinus urogénital. Sur leur trajet, ils croisent les canaux de Wolff et se rejoignent pour fusionner juste avant de s'insérer sur le sinus urogénital au niveau du tubercule de Müller (Schoenwolf, 2009).

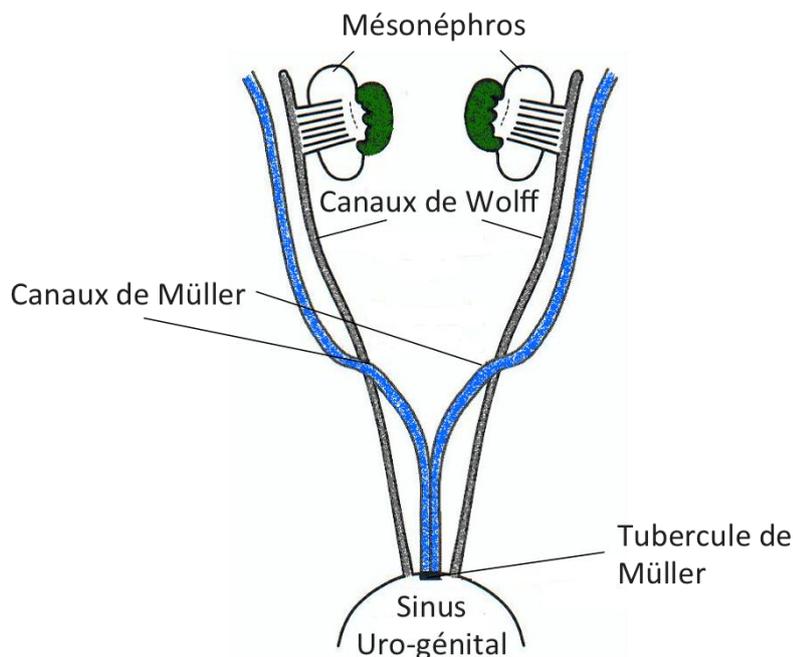


Figure 2. Schéma des conduits génitaux au stade indifférencié vers la fin de la 6<sup>ème</sup> semaine de développement.

La structure en vert adossée au mésonéphros représente la gonade en formation.

Les organes génitaux externes se forment à partir de la 3<sup>ème</sup> - 4<sup>ème</sup> semaine de développement autour de la membrane cloacale à la confluence des voies génitales et urinaires. Au début de la 5<sup>ème</sup> semaine se forment les bourrelets cloacaux de chaque côté de la membrane cloacale par épaissement du mésenchyme caudal qui soulève l'ectoderme de la membrane cloacale. Ces bourrelets cloacaux fusionnent en avant pour former le tubercule génital. A 8 semaines, le septum uro-rectal sépare complètement le sinus urogénital du canal ano-rectal. Une fois les deux membranes séparées, les bourrelets cloacaux prennent le nom de bourrelets génitaux et la rupture de la membrane du sinus urogénital laisse apparaître la plaque urétrale autour de laquelle vont se former les replis génitaux, situés en-dedans des bourrelets génitaux (Encha-Razavi and Escudier, 2008; Schoenwolf, 2009; Yamada et al., 2003).

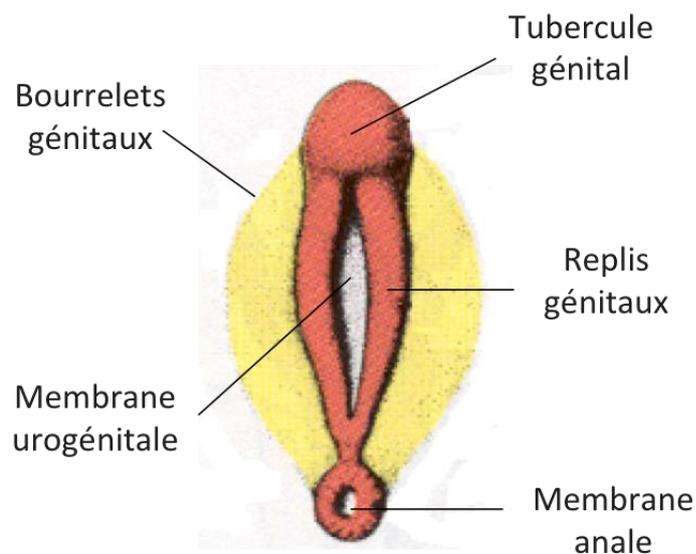


Figure 3. Aspect des organes génitaux externes à la fin de la 8<sup>ème</sup> semaine de développement. Le septum uro-rectal cloisonne le cloaque avec la présence de la membrane urogénitale en avant et de la membrane anale en arrière.

## **b) La différenciation masculine**

La différenciation du tractus génital masculin se fait sous la dépendance d'hormones sécrétées par le testicule. En effet, au moment de leur différenciation, les cellules de Sertoli commencent à sécréter une hormone glycoprotéique, l'AMH (Anti Müllerian Hormone). Celle-ci va alors se fixer sur son récepteur AMHR2 (anti-Müllerian hormone receptor type 2) présent à la surface des cellules du mésenchyme entourant les canaux de Müller responsable de leur régression entre la 8<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> semaine de développement (Allard et al., 2000). Seuls quelques reliquats müllériens vont persister, notamment au niveau de l'extrémité céphalique sous la forme de l'hydatide sessile située au pôle supérieur du testicule et à l'extrémité caudale sous la forme de l'utricule prostatique, expansion de l'urètre prostatique.

Par ailleurs, à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine de développement, les cellules de Leydig sécrètent la testostérone. Cette hormone stéroïde va agir sur ses tissus cibles par l'intermédiaire de son récepteur spécifique intracellulaire, le récepteur aux androgènes AR (Androgen Receptor). L'action de la testostérone va permettre le maintien et le développement du canal de Wolff à partir de la 9<sup>ème</sup> - 10<sup>ème</sup> semaine de développement. Le canal de Wolff est à l'origine de l'épididyme, du canal déférent, des vésicules séminales et des canaux éjaculateurs. Les canaux efférents, pour leur part, proviennent de la prolifération d'une dizaine de tubules mésonéphrotiques situés en regard de la future gonade, à partir de la 9<sup>ème</sup> semaine. Ces canaux vont alors aller au contact des cordons du rete testis permettant de connecter les cordons séminifères à l'épididyme vers le 3<sup>ème</sup> mois de développement.

La différenciation des organes génitaux externes masculins se fait sous la dépendance de la dihydrotestostérone (DHT), un dérivé de la testostérone après action de l'enzyme 5-alpha réductase (SRD5A2) au niveau des tissus cibles (Andersson et al., 1991). La DHT va permettre l'allongement du tubercule génital, à partir de la 6<sup>ème</sup> semaine, ce qui entraîne un étirement de la plaque urétrale et un rapprochement des replis génitaux formant une gouttière génitale à la face inférieure du pénis. Les bords de la gouttière vont fusionner pour former l'urètre pénien qui est complètement tubulisé à la fin de la 14<sup>ème</sup> semaine. Celui-ci est en continuité avec l'urètre membraneux dans sa partie proximale mais borgne dans sa partie distale. En effet, l'urètre balanique et le gland dérivent, eux, de l'extrémité du tubercule génital. L'urètre balanique provient d'un repli de l'épiderme recouvrant le gland qui s'invagine en direction de l'extrémité de l'urètre pénien qui va ensuite se creuser (Yamada et

al., 2003). Par ailleurs, les bourrelets génitaux fusionnent sur la ligne médiane pour donner le scrotum dans lequel les testicules migrent après le 6<sup>ème</sup> mois de développement (Encha-Razavi and Escudier, 2008; Schoenwolf, 2009).

### c) **La différenciation féminine**

La différenciation des voies génitales féminines débute vers la 7<sup>ème</sup> semaine et ceci en l'absence de testostérone et d'AMH. L'absence de testostérone est responsable de la disparition des canaux de Wolff tandis que l'absence d'AMH permet le développement des canaux de Müller. La partie crâniale des canaux de Müller va donner naissance au pavillon et à la trompe tandis que leur partie distale fusionne pour donner naissance au canal utéro-vaginal à l'origine de l'utérus. La paroi médiane du canal utéro-vaginal disparaît vers la fin du 3<sup>ème</sup> mois. La différenciation de la partie caudale des voies génitales féminine est plus complexe. En effet, le sinus uro-génital, au niveau du tubercule de Müller, s'épaissit pour former un massif épithélial plein. Ce massif épithélial en association avec le tubercule de Müller forme la plaque vaginale qui se creuse ensuite d'une lumière pour former le vagin. Celui-ci est en continuité avec le col utérin dans sa partie antérieure et fermé à l'entrée par une membrane, l'hymen (Encha-Razavi and Escudier, 2008; Schoenwolf, 2009).

Au niveau des organes génitaux externes, en l'absence de testostérone, chez la femme, le tubercule génital s'allonge très peu puis régresse pour former le clitoris. Les bourrelets génitaux restent séparés et forment les grandes lèvres, tout comme les replis génitaux qui restent également séparés et forment les petites lèvres. Le sinus urogénital reste ouvert avec l'abouchement de l'urètre à la partie antérieure et l'orifice vaginal à la partie postérieure.

## **B. Facteurs génétiques impliqués dans le développement gonadique**

Le développement embryonnaire dépend de la communication intercellulaire permettant la différenciation et le développement de différents types cellulaires et tissus. Cette communication intercellulaire est sous la dépendance de voies de signalisation et de facteurs de transcription qui entraînent la modification de l'expression de gènes. La majorité des effecteurs agissent sur des promoteurs ou des *enhancers* de gènes. La plupart des voies de signalisation impliquées dans le développement embryonnaire ont également été impliquées dans le développement gonadique.

### **1. La gonade bi-potentielle**

Concernant le développement de la gonade bi-potentielle, en 2012, Chassot et al. ont démontré le rôle de la voie de signalisation WNT et en particulier le rôle des deux ligands WNT4 (Wnt family member 4) et RSPO1 (R-spondin 1) dans la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique. En effet, les souris *knock out* pour *Wnt4* et/ou *Rspo1*, qu'elles soient XX ou XY, présentent une diminution de la prolifération cellulaire au niveau des crêtes génitales (Chassot et al., 2012). De manière intéressante, ces deux facteurs sont les déterminants majeurs de la différenciation ovarienne, nous détaillerons plus précisément leur rôle par la suite.

Par ailleurs, les études chez des patients présentant des anomalies de développement urogénital, ainsi que l'étude des modèles murins, ont permis de mettre en évidence d'autres facteurs indispensables à la formation de la gonade indifférenciée chez les mammifères et en particulier les gènes *WT1*, *NR5A1*, *Emx2* ou *Lhx9*.

#### **a) *WT1***

Le gène *WT1* (*Wilms tumor 1*) a été identifié initialement chez des patients présentant des tumeurs rénales particulières : les tumeurs de Wilms (Call et al., 1990; Rose et al., 1990). Ce gène situé sur le chromosome 13 code pour une protéine en doigt de zinc se liant à l'ADN. Elle a un rôle d'activateur ou de répresseur de la transcription en fonction du contexte cellulaire ou chromosomique. Le gène *WT1* joue un rôle majeur dans le développement de l'appareil uro-génital avec une expression au niveau du mésenchyme condensé, des vésicules

rénales et de l'épithélium glomérulaire du rein en développement ainsi qu'au niveau des crêtes génitales dès la 6<sup>ème</sup> semaine de développement puis dans la gonade fœtale (De Santa Barbara et al., 2000; Pritchard-Jones et al., 1990). Plusieurs isoformes ont été identifiées mais deux isoformes majeures sont impliquées dans le développement gonadique : les isoformes WT1(+KTS) et WT1(-KTS). Ces deux isoformes diffèrent par la présence (+KTS) ou l'absence (-KTS) de trois acides aminés (lysine-thréonine-sérine) entre le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> doigt de zinc. Il a été montré chez la souris que c'est l'isoforme WT1(-KTS) spécifiquement qui se lie au promoteur du gène *Nr5a1* (*nuclear receptor subfamily 5 group A member 1*) pour permettre son expression et son action lors du développement de la gonade (Wilhelm, 2002). Cette isoforme permet également l'activation du gène *SRY* (*sex determining region Y*) conduisant au développement d'une gonade masculine, en se liant à son promoteur (Hossain and Saunders, 2001). En revanche, l'isoforme WT1(+KTS) semble jouer un rôle essentiel dans le maintien de la différenciation de cette gonade masculine en régulant le transcrit *SRY* (Hammes et al., 2001). Il joue également un rôle dans la différenciation des voies génitales masculines puisqu'il permet l'augmentation de l'expression de l'*AMH* en se fixant, avec *NR5A1*, sur son promoteur (Arango et al., 1999). Les études chez la souris confirment le rôle de *Wt1* dans le développement urogénital : des souris mutées pour *Wt1* présentent une absence de développement des reins et des gonades (Kreidberg et al., 1993). Chez l'homme, les mutations ou les délétions du gène *WT1* sont responsables de différents syndromes : syndrome de Frasier, syndrome de Denys Drach ou syndrome WAGR (tumeur de Wilms, aniridie, anomalies génito-urinaires, retard mental). Dans tous les cas, il existe des malformations urogénitales et un risque accru de néphroblastome.

### **b) NR5A1**

Le gène *NR5A1* code pour la protéine SF1 (Steroidogenic factor 1) qui appartient à la super famille des récepteurs nucléaires. C'est un homologue du gène *Drosophila Ftzf1*. L'étude chez la souris a montré que lorsque l'expression de *Ftzf1* était supprimée les souris avaient une absence de développement des glandes surrénales et des gonades responsable d'une dysgénésie gonadique et d'une mort précoce à J8 par insuffisance surrénalienne (Luo et al., 1994). SF1 est exprimé très tôt au cours du développement gonadique puisque lors de la 6<sup>ème</sup> semaine, on retrouve son expression au niveau de l'épithélium cœlomique et au niveau des cellules de soutien de la gonade bi-potentielle en développement (De Santa Barbara et al., 2000). Il est également exprimé dans tous les tissus synthétisant des stéroïdes. L'expression au

niveau de la gonade bi-potentielle est détectée avant celle de l'AMH, puisque WT1 et NR5A1 sont capables de se fixer sur les régions promotrices de l'AMH, NR5A1 potentialisant l'effet de WT1 pour augmenter l'expression de l'AMH (Arango et al., 1999). Par ailleurs, le gène *NR5A1* est un gène important du développement testiculaire. Sa fonction dans le développement de la gonade masculine est détaillée plus loin.

**c) *Emx2***

Le gène *Emx2* (*Empty spiracles homeobox 2*) code pour un facteur de transcription exprimé au niveau du système nerveux central mais également au niveau des cellules épithéliales de l'appareil urogénital en développement (Pellegrini et al., 1997). Les souris *Emx2*<sup>-/-</sup> présentent une absence complète de développement des voies urogénitales dérivant du mésonéphros et en particulier les reins, les gonades, les uretères et les voies génitales. Ceci est dû à une diminution du nombre de cellules épithéliales migrant vers le mésenchyme probablement lié à une anomalie de la polarisation des cellules en division et à une anomalie de leur migration (Kusaka et al., 2010). En revanche, le développement de la vessie et des glandes surrénales est conservé. Aucune mutation dans ce gène n'a été rapportée jusqu'à maintenant chez l'Homme. En revanche, il a été rapporté le cas d'un patient ayant un caryotype 46,XY avec une délétion de *EMX2* mais qui ne comprenait pas *FGFR2* (*fibroblast growth factor receptor 2*), un autre gène impliqué dans le déterminisme testiculaire à travers la régulation de l'expression de SOX9 (SRY-box 9). Cet enfant présentait une anomalie des organes génitaux externes associant un micropénis, un hypospadias postérieur et une ectopie testiculaire bilatérale. L'examen histo-pathologique des gonades montrait des tubules séminifères rares ne contenant que des cellules de Sertoli et une absence de spermatogonies (Piard et al., 2014).

**d) *Lhx9***

De la même manière, les souris *Lhx*<sup>-/-</sup> présentent des anomalies de développement et de prolifération des cellules de soutien de la gonade bi-potentielle responsable de l'absence de développement de cette dernière. Birk et al., en 2000, ont montré que ces souris *Lhx*<sup>-/-</sup> avaient une expression de SF1 diminuée. En effet, le gène *LHX9* (*LIM homeobox 9*) code pour un facteur de transcription contenant deux domaines fonctionnels : un domaine de liaison à l'ADN et un domaine impliqué dans les interactions protéines-protéines. *In vitro*, la protéine

LHX9 est capable de se lier directement au promoteur de *Nr5a1* pour permettre son activation et cela en présence ou non de WT1 (Wilhelm, 2002). Ceci suggère donc que l'action de LHX9 serait située en amont de celle de SF1. Même si ce gène semble jouer un rôle dans la mise en place de la gonade indifférenciée chez les mammifères, de nombreuses études réalisées chez l'homme n'ont pas permis jusqu'à maintenant de mettre en évidence son implication en pathologie (Lucas-Herald and Bashamboo, 2014).

**e) CBX2**

Le gène *CBX2* (*Chromobox homolog 2*) code pour une protéine appartenant au complexe multiprotéique Polycomb qui joue un rôle dans le maintien des profils d'expression de nombreux gènes lors du développement par l'intermédiaire du remodelage chromatinien ou bien la modification d'histones. *Cbx2* est impliqué dans le développement des crêtes génitales. La majorité des souris *KO* pour *Cbx2* meurent précocement et les souris mâles XY présentent un phénotype féminin. Les souris XX, pour leur part, présentent une diminution du volume ovarien comparé aux souris WT. Le développement des crêtes génitales est retardé chez ces souris, aussi bien chez les mâles que chez les femelles (Katoh-Fukui et al., 1998). De plus, il a été montré que l'expression de *Nr5a1* était diminuée chez les souris *Cbx2*<sup>-/-</sup> suggérant un rôle dans la régulation de son expression. Enfin, *Cbx2* serait également impliqué dans l'expression de *Sry* puisque chez les souris XY *Cbx2*<sup>-/-</sup> le phénotype masculin peut être rétabli lorsqu'elles sont croisées avec des souris surexprimant SRY ou SOX9 (Katoh-Fukui et al., 2012). Ce gène semble également être impliqué dans le développement gonadique chez l'homme puisqu'il a été rapporté le cas d'une patiente ayant un caryotype 46,XY avec un développement ovarien qui était porteuse de deux mutations hétérozygotes dans le gène *CBX2* (Biason-Lauber et al., 2009).

**f) GATA4**

Le gène *GATA4* (*GATA binding protein 4*) appartient à la famille des gènes codant pour des facteurs de transcription en doigt de zinc reconnaissant le motif GATA présent dans la région promotrice de nombreux gènes. Il joue un rôle majeur dans le développement cardiaque mais également dans le développement gonadique. En effet, son expression est détectée très précocement dans la gonade bi-potentielle chez les souris XX et XY au niveau des cellules de soutien mais pas dans les PGCs (Viger et al., 1998). Les études chez la souris

ont montré une expression progressive de GATA4 depuis la partie antérieure de l'épithélium cœlomique vers la partie postérieure, immédiatement avant l'épaississement de cet épithélium. De plus, le *KO Gata4* étant léthal chez la souris avant le développement des crêtes génitales, un modèle de *KO* conditionnel a permis de montrer une absence d'initiation du développement des crêtes génitales dû à une absence de prolifération de l'épithélium cœlomique qui reste sous une forme monocouche (Hu et al., 2013; Molkentin et al., 1997). Du point de vue moléculaire, on note l'absence d'expression de *Lhx9* et *Nr5a1*. GATA4 est donc indispensable au développement de la gonade bi-potentielle aussi bien chez les souris XX que les souris XY. Il joue également un rôle important dans le développement du testicule puisqu'avec son co-facteur ZFP281 (zinc finger protein, FOG family member 2; anciennement FOG2), il permet l'expression de *SRY* (Voir la section *SRY*).

Un aperçu des facteurs impliqués dans la gonade bi-potentielle est présenté dans la Figure 4.

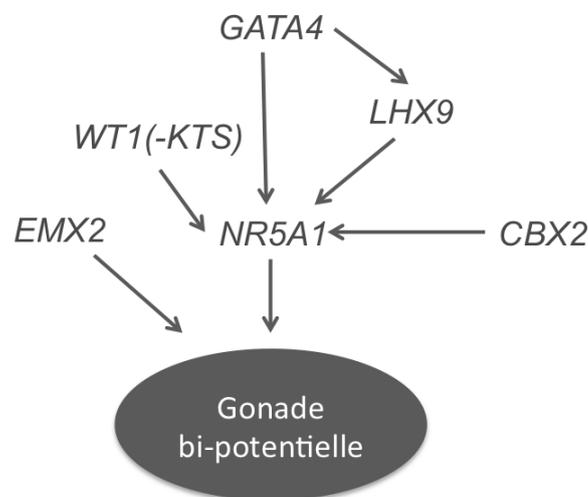


Figure 4. Aperçu des facteurs impliqués dans le développement de la gonade bi-potentielle.

La différenciation de la gonade bi-potentielle en testicule ou en ovaire dépend ensuite de la balance entre l'expression des facteurs des voies de signalisation pro-testiculaires (*SRY*, *SOX9*) et pro-ovariens (*WNT/β-catenine*).

## 2. Le développement testiculaire

La différenciation des cellules de soutien en cellules pré-Sertoliennes puis en cellules de Sertoli est le premier évènement de la différenciation de la gonade bi-potentielle en testicule. L'expression du gène *SRY* est le premier signe de l'orientation de la gonade indifférenciée vers une gonade masculine.

### a) *SRY*

Le gène *SRY* appartient à la famille des gènes *SOX* (*SRY-related high-mobility group (HMG) box*). Ce sont des facteurs de transcription caractérisés par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN de type boîte HMG et favorisant la différenciation cellulaire. Le gène *SRY* a été identifié en 1990, par Andrew Sinclair qui travaillait alors dans l'équipe anglaise dirigée par Peter Goodfellow (Sinclair et al., 1990). Depuis de nombreuses années, l'existence d'un ou plusieurs gènes situés sur le chromosome Y responsables du développement testiculaire était connue. Une première région avait été identifiée sur le chromosome Y en étudiant des patientes à caryotype 46,XY présentant une absence de développement testiculaire. Cette région avait été nommée *TDF* pour Testis-Determining Factor et un gène codant pour une protéine en doigt de zinc nommé ZFY (zinc finger protein Y) avait été proposé comme gène candidat, mais dans les deux années qui ont suivies, plusieurs arguments sont venus réfuter cette hypothèse (Page et al., 1987; Pritchard et al., 1987). En 1990, le gène *SRY* localisé sur le bras court du chromosome Y a ensuite été identifié en étudiant cette fois-ci quatre patients ayant un caryotype 46,XX et qui présentaient un développement testiculaire. Ces patients partageaient une région commune du chromosome Y de 35 kb. L'étude approfondie de cette région chez l'homme ainsi que chez la souris et le bovin a permis de mettre en évidence un *ORF* (*Open Reading Frame*) codant pour un gène constitué d'un seul exon et qui fut nommé *SRY*. L'ensemble de la séquence codante n'est pas parfaitement conservée chez l'homme et la souris mais il existe une région commune de 79 acides aminés ayant une homologie avec un motif de liaison à l'ADN présent dans le groupe des protéines HMG. L'implication de ce gène dans le développement testiculaire a été confirmé par la mise en évidence de mutations dans

la séquence codante chez des patientes à caryotypes 46,XY avec une absence de développement testiculaire (Gubbay et al., 1990). En 1991, Koopman et al. ont démontré que *SRY* était nécessaire et suffisant pour obtenir un développement testiculaire chez des souris XX (Koopman et al., 1991). Chez la souris, l'expression de *Sry* débute dans la partie médiane de la crête génitale et se propage vers les deux pôles de la gonade bi-potentielle. Cette expression est détectée au niveau des cellules somatiques qui vont alors se transformer en cellules de Sertoli (Kidokoro et al., 2005; Sekido et al., 2004). Les études chez l'homme ont montré que l'expression de *SRY* débute vers la fin de la 6<sup>ème</sup> semaine (Hanley et al., 2000). Le pic d'expression est détecté au cours de la 7<sup>ème</sup> semaine puis l'expression diminue et persiste à un faible niveau durant la suite du développement (Hanley et al., 2000).

L'activation de l'expression de *SRY* est régulée par certains gènes indispensables au développement de la gonade bi-potentielle. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'isoforme (-KTS) de *Wtl* est capable de se fixer sur le promoteur de *SRY* pour permettre sa transactivation mais, chez la souris, l'absence de cette isoforme n'entraîne qu'une réduction du volume de la gonade (Hossain and Saunders, 2001). En revanche, l'isoforme (+KTS) qui ne se lie pas au promoteur de *SRY* semble indispensable au développement testiculaire puisque les souris *KO* pour cette isoforme présentent une réversion sexuelle complète (Hammes et al., 2001). L'isoforme (+KTS) joue un rôle post-transcriptionnel en régulant la traduction de l'ARNm (Bor et al., 2006). Le gène *NR5A1* a également été évoqué comme gène nécessaire à l'expression de *SRY*. L'étude des souris *Sfi*<sup>-/-</sup> montre une régression complète des gonades et une absence complète d'expression de *Sry* (Luo et al., 1994). Le gène *GATA4*, dont nous avons vu le rôle dans le développement de la gonade bi-potentielle, est également impliqué dans l'expression de *SRY* avec son co-facteur *ZFPM2(FOG2)*. Les souris *KO Fog2*<sup>-/-</sup> ou bien les souris *KI Gata4*<sup>ki/ki</sup> pour une mutation altérant l'interaction GATA4/ZFPM2 présentent des anomalies du développement gonadique : le niveau du transcrit *Sry* est fortement diminué et les gènes cibles de *SRY* ne sont pas exprimés. En revanche, il existe une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le développement ovarien tel que *Wnt4* (Tevosian et al., 2002). Chez l'homme, des mutations de *FOG2* altérant l'interaction FOG2/GATA4 ont été identifiées chez des patients 46,XY présentant une dysgénésie gonadique (Bashamboo et al., 2014). En 2013, Fujimoto et al. ont identifié deux facteurs de transcription qui régulaient également l'expression de *Fog2* : SIX1 (SIX homeobox 1) et SIX4 (SIX homeobox 4). Ils ont montré que les souris XY double *KO Six1*<sup>-/-</sup>; *Six4*<sup>-/-</sup> présentaient un phénotype féminin avec une absence d'expression de *Sry* (Fujimoto et al., 2013). Plus récemment, d'autres gènes ont

été impliqués dans la régulation de l'expression de *SRY*. En 2009, il a été montré que l'altération de l'expression de *Map3k4* (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4*), un gène appartenant à la voie de signalisation phylogénétiquement ancienne des MAPK, par une mutation à l'état homozygote chez la souris XY entraîne une réversion sexuelle complète. L'analyse des gonades montre une très forte réduction de l'expression de *Sry* et de *Sox9* au moment crucial de leur expression. De plus, la présence de MKK4 (*mitogen-activated protein kinase kinase 4*) activée, qui est une cible directe de *Map3k4*, au niveau de l'épithélium cœlomique des gonade XY permet d'établir le lien entre la voie de signalisation de MAPK impliquée dans la prolifération cellulaire des cellules de soutien et l'expression de *Sry* (Bogani et al., 2009). De manière intéressante un autre gène de la famille MAPK, *MAP3K1*, a été impliqué dans des cas d'anomalie du développement de la gonade chez des patients 46,XY (Pearlman et al., 2010). Le gène *Gadd45γ* (*growth arrest and DNA damage inducible gamma*) qui appartient à la voie de signalisation des MAPK interagit avec MAP3K4 au moment de la différenciation testiculaire. Une surexpression de *Map3k4* chez les souris XY *Gadd45γ*<sup>-/-</sup> qui présentent normalement une réversion sexuelle, permet de rétablir un phénotype masculin (Warr et al., 2012). *Gadd45γ* est donc probablement situé en amont de *Map3k4*. Enfin, Kuroki et al. ont mis en évidence le rôle de *Jmjd1a* (*lysine demethylase 3A*) qui code pour une histone H3K9 déméthylase, dans la régulation épigénétique de l'expression de *Sry*. Il contrôle directement et positivement l'expression de *SRY* en régulant les marques d'histone H3K9me2 (Kuroki et al., 2013). Un aperçu des facteurs impliqués dans la régulation de l'expression de *SRY* est rapporté dans la Figure 6 p.40.

L'étude des patients ayant un caryotype 46,XX avec un développement testiculaire a permis de mettre en évidence le rôle de *SRY* dans le développement testiculaire. Cependant, l'expression de *SRY* est transitoire chez la souris et très faible après la 7<sup>ème</sup> semaine de développement chez l'homme. Par ailleurs, environ 10% des patients ayant un caryotype 46,XX avec un développement testiculaire n'ont pas de séquence *SRY*. Un autre facteur en aval de *SRY* joue donc un rôle majeur dans le développement testiculaire. C'est le gène *SOX9*, cible principale de *SRY*, qui est le véritable chef d'orchestre de la différenciation testiculaire.

**b) SOX9**

Le gène *SOX9* est en effet la cible principale de *SRY*. Il appartient au groupe E de la famille des gènes *SOX* avec les gènes *SOX8* (*SRY-box 8*) et *SOX10* (*SRY-box 10*). Il joue un rôle entre autre dans la différenciation des chondrocytes et est responsable lorsqu'il est muté, de la dysplasie campomélique associée à une réversion sexuelle chez 75% des patients 46,XY (Foster et al., 1994). L'étude de l'expression de *SOX9* au niveau gonadique, montre que celui-ci est exprimé dès la 6<sup>ème</sup> semaine de développement, avant la différenciation de la gonade bipotentielle, au niveau du cytoplasme des cellules somatiques chez les embryons masculins et féminins (De Santa Barbara et al., 2000; Morais da Silva et al., 1996). Durant la 7<sup>ème</sup> semaine, au moment de la différenciation testiculaire, l'expression de *SOX9* est retrouvée au niveau des noyaux des cellules de Sertoli chez les embryons XY tandis que seule une expression au niveau du cytoplasme est retrouvée chez les embryons XX (Malki et al., 2005). L'expression de *SOX9* est détectée rapidement après celle de *SRY* selon le même profil d'expression, depuis la partie médiale de la gonade en direction des deux pôles, avec une détection de l'expression maximale à la fin de la 7<sup>ème</sup> semaine. A la différence de *SRY*, l'expression de *SOX9* est maintenue au niveau des cellules de Sertoli des cordons sexuels jusqu'à 18 semaines (Hanley et al., 2000).

Il a été montré chez la souris que l'expression de *Sox9* est activée par la fixation de *SRY* en association avec SF1 sur une région *enhancer* spécifique de 1,4 kb située environ 13 kb en amont de *Sox9* correspondant à la région *Tesco* (*testis-specific core element*) dans les cellules pré-Sertoliennes (Sekido and Lovell-Badge, 2008). Des modèles de souris mutées dans les régions de fixation de *SRY* et SF1 au sein de *Tesco* ont été développés et montrent une abolition de l'expression de *Sox9* suggérant que *SRY* et SF1 régulent positivement de manière synergique l'expression de *Sox9*. Chez l'homme, la séquence homologue a été identifiée à 14 kb en amont de *SOX9*, mais aucune mutation ou réarrangement n'a été identifié jusqu'à maintenant chez des patients présentant des anomalies du développement testiculaire, suggérant l'existence d'un *enhancer* testiculaire spécifique chez l'homme (Georg et al., 2010). En 2011, trois publications ont rapporté des cas de patients qui présentaient une région commune dupliquée (patients 46,XX avec développement testiculaire) ou délétée (patientes 46,XY avec dysgénésie gonadique) et nommée RevSex (Benko et al., 2011; Cox et al., 2011; Vetro et al., 2011). La région minimale impliquée est de 68 kb et est située environ 500 kb en amont de *SOX9* dans un désert génique.

Une fois le niveau d'expression de *SOX9* suffisant, le maintien de son expression au-delà de la 8<sup>ème</sup> semaine se fait par la mise en place d'une boucle de régulation positive incluant *SOX9* lui-même par l'intermédiaire de *Tesco*, mais également d'autres voies de régulation dont *FGF9* (*fibroblast growth factor 9*) et *PTGDS* (*prostaglandin D2 synthase*). En effet, chez la souris, *SOX9* active l'expression de *Fgf9* qui en retour stimule l'expression de *Sox9* générant une boucle de rétrocontrôle positive entre *Sox9* et *Fgf9* par l'intermédiaire du récepteur *FGFR2* (Kim et al., 2006, 2007). Chez l'homme, plusieurs patients (46,XY) présentant une grande délétion de la région terminale du bras long d'un chromosome 10 incluant *FGFR2* ont été rapportés. Tous les patients présentaient une cryptorchidie et quasiment toujours une anomalie des organes génitaux externes avec un hypospadias (Wilkie et al., 1993). De la même manière, Chiang et al. ont rapporté le cas d'un patient à caryotype 46,XX, SRY- qui présentait une duplication du gène *FGF9* (Chiang et al., 2013).

La deuxième voie de régulation de l'expression de *SOX9* dans les cellules pré-Sertoliennes se fait par l'intermédiaire de la PGD(2) (prostaglandine D(2)). En effet, pour assurer la différenciation d'un nombre suffisant de cellules de Sertoli, le testicule produit de la PGD(2) permettant le recrutement des cellules de soutien pour se différencier en cellules de Sertoli. Chez la souris, l'expression de *Ptgds* codant pour la PGD(2) débute immédiatement après le début de l'expression de *Sox9* suite à la fixation de la protéine *SOX9* sous une forme dimérisée sur le promoteur de *Ptgds* permettant sa transactivation (Wilhelm et al., 2007b). Une fois la production testiculaire de PGD(2) activée, celle-ci entraîne la transcription de *Sox9* et son transport vers le noyau. Ce système contribue à l'amplification de l'expression de *Sox9* et à son activité au cours du développement testiculaire (Moniot et al., 2009).

Une autre cible directe de *SOX9* est le gène *AMH* codant pour l'hormone anti-mullerienne. En effet, il a été montré que *SOX9* se fixe sur un *enhancer* proche du promoteur d'*AMH* pour l'activer. Cette activation se fait en association avec SF1 par l'intermédiaire d'une interaction directe entre *SOX9* et SF1 (De Santa Barbara et al., 1998). L'expression d'*AMH* est identifiable à partir de 6,5 semaines de développement au niveau des cellules de Sertoli uniquement. Aucune expression d'*AMH* n'est en revanche détectée dans l'ovaire (De Santa Barbara et al., 2000). Cette sécrétion d'*AMH* permet la régression des canaux du Müller à partir de la 8<sup>ème</sup> - 9<sup>ème</sup> semaine de développement.

c) **Autres gènes *SOX***

Nous avons vu que *SRY* et *SOX9* appartiennent à la famille des gènes *SOX*. Ces gènes sont classés par groupe en fonction de la conservation de la séquence de leur domaine HMG, de leur degré d'homologie et de l'organisation générale des domaines de la protéine (Bowles et al., 2000) (voir Tableau 1).

Tableau 1. Tableau des groupes de gènes *SOX*.

Groupe	Gènes
SOXA	SRY
SOXB1	SOX1, SOX2, SOX3
SOXB2	SOX14, SOX21
SOXC	SOX4, SOX11, SOX12
SOXD	SOX5, SOX6, SOX13
SOXE	SOX8, SOX9, SOX10
SOXF	SOX7, SOX17, SOX18
SOXG	SOX15
SOXH	SOX30

Le gène *SOX9* appartient au groupe E avec les gènes *SOX8* et *SOX10*. De manière intéressante, le gène *SOX8*, situé sur le chromosome 16, a le même profil d'expression que *SOX9* lors du développement de la gonade. Chez la souris, son expression apparaît au niveau des cellules de Sertoli environ 12 heures après celle de *Sox9* mais avant celle d'*Amh* (Schepers et al., 2003). *In vitro*, *SOX8* peut se fixer sur la séquence promotrice d'*Amh* et en interaction avec SF1 permettre son activation (Schepers et al., 2003). De la même manière, les études chez les souris double *KO Sox9<sup>-/-</sup>* et *Sox8<sup>-/-</sup>* suggèrent que *SOX8* renforce le rôle de *SOX9* lors de la différenciation testiculaire (Chaboissier et al., 2004). *SOX8* joue également un rôle dans le maintien de la fertilité chez les souris. En effet, les souris mâles *Sox8<sup>-/-</sup>* qui sont initialement fertiles présentent une diminution progressive de fertilité du fait d'une dégénération progressive des tubules séminifères par altération des interactions entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales en développement (Barrionuevo et al., 2009; O'Bryan et al., 2008).

L'autre membre du groupe E, le gène *SOX10* situé sur le chromosome 22 est également exprimé au cours du développement de la gonade. Il est d'abord exprimé dans la gonade indifférenciée chez les deux sexes puis, lors du développement testiculaire, son profil d'expression est comparable à celui de *Sox9* et *Sox8* (Cory et al., 2007). L'expression de *Sox10* sous la dépendance du promoteur de *Wtl* chez des souris XX permet un développement testiculaire chez ces souris. En pathologie humaine, des duplications du chromosome 22 contenant *SOX10* ont été rapportées chez des hommes ayant un caryotype 46,XX avec un développement testiculaire (Polanco et al., 2010).

Les profils d'expression similaires des gènes *SOX* - E et leur capacité à réguler les cibles de *SOX9* suggèrent un rôle redondant de ces gènes lors du développement testiculaire chez les mammifères. Ceci est renforcé par les études menées chez des souris XX *Rspo1(KO)* *Sox9(cKO)* qui présentent un développement testiculaire en l'absence d'expression de *SOX9* et chez lesquelles est retrouvée une expression de *SOX8* et *SOX10* (Lavery et al., 2012).

Le gène *SOX3* (*SRY-box 3*), situé sur le chromosome X et appartenant au groupe B des gènes de la famille *SOX*, semble également être intéressant pour le développement gonadique. En effet, *SOX3* serait le précurseur de l'ancêtre de *SRY* et donc pourrait jouer un rôle dans le développement testiculaire (Graves, 1998). Les études menées sur le modèle murin montrent que *Sox3* est exprimé au niveau du noyau des cellules de Sertoli alors qu'il ne l'est pas dans l'ovaire en développement. Les souris *KO Sox3<sup>-/-</sup>* présentent un retard de croissance et de développement mais pas d'anomalies du développement testiculaire chez les souris XY. En revanche, il existe aussi bien chez les souris XX que les souris XY des troubles de fertilité (Weiss et al., 2003). Au contraire, la surexpression de *Sox3* chez les souris XX est responsable d'un développement testiculaire grâce à la fixation de *SOX3* à la place de *SRY* permettant l'activation de l'expression de *SOX9* (Sutton et al., 2011). Ceci a également été observé chez l'homme où des duplications de *SOX3* et des réarrangements de la région de *SOX3* ont été retrouvés chez des patients ayant un caryotype 46,XX avec un développement testiculaire. Le mécanisme proposé pour expliquer la réversion sexuelle chez ces patients est le réarrangement du locus de *SOX3* du fait d'une duplication ou d'une délétion entraînant une expression ectopique de *SOX3* par création d'un *enhancer* gonadique ou ablation d'un élément répresseur responsable de l'activation de la voie de différenciation testiculaire (Sutton et al., 2011). Ceci est intéressant car il semblerait que ce soit une modification des régions

régulatrices qui soient responsables du phénotype comme c'est le cas pour les duplications en amont de *SOX9*.

**d) *NR0B1***

L'observation d'un syndrome des gènes contigus associant une hypoplasie congénitale des surrénales (AHC : Adrenal Hypoplasia Congenita), un déficit en glycérol kinase (GKD : Glycerol Kinase Deficiency) et une dystrophie musculaire de Duchenne (DMD : Duchenne Muscular Dystrophy) a permis de définir une région du bras court du chromosome X (Xp21) contenant le gène *DAX1* (Dosage sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region, X chromosome gene 1) dont les mutations furent décrites comme étant associées à l'AHC et à un hypogonadisme hypogonadotrope (Muscatelli et al., 1994). Dans le même temps, des duplications de cette région du chromosome X, dénommée DSS (Dosage Sensitive Sex reversal), furent décrites chez des sujets 46,XY présentant une dysgénésie gonadique avec un phénotype féminin (Bardoni et al., 1994).

La protéine DAX1 est un récepteur nucléaire codé par le gène *NR0B1* (*nuclear receptor subfamily 0 group B, member 1*). Les études chez la souris ont montré que le profil d'expression de *Nr0b1* était similaire à celui de *Nr5a1* mais avec un léger décalage dans le temps (Ikeda et al., 1996). Il est exprimé dans les deux sexes au moment du développement de la gonade bi-potentielle puis son expression persiste dans le testicule alors qu'elle diminue dans l'ovaire en développement. Les observations chez l'homme ainsi que certaines études sur les modèles de souris ou les modèles cellulaires suggèrent que DAX1 inhibe l'activité de SF1 en empêchant sa fixation sur *Tesco* (Ludbrook et al., 2012; Nachtigal et al., 1998). Des études réalisées chez la souris ont montré que les souris XY ayant une sur-expression de DAX1 de manière homozygote ne présentaient pas de réversion sexuelle mais des anomalies du développement testiculaire responsable d'une infertilité, en faveur du rôle anti-testiculaire de DAX1 (Swain et al., 1998). Mais d'autres études, également chez la souris, réalisées par la suite ont montré que les souris XY déficiente pour *NR0B1* présentaient également des anomalies du développement du testicule, suggérant cette fois-ci un rôle pro-testiculaire (Meeks et al., 2003). Ceci est également retrouvé chez les patients ayant une mutation de *NR0B1*. En effet, ces patients ont un développement testiculaire mais il existe tout de même

une désorganisation des cordons testiculaires associé à un hypogonadisme hypogonadotrophique d'origine hypothalamo-hypophysaire (Muscatelli et al., 1994). Afin d'expliquer qu'un défaut ou un excès de DAX1 conduise quasiment aux mêmes effets, Ludbrook et Harvey ont proposé un modèle où l'activité pro-testiculaire de DAX1 se ferait dans une certaine gamme de concentration et qu'en dehors de ces limites, il y aurait un effet négatif sur le développement testiculaire (Ludbrook and Harley, 2004) (Figure 5). Au total, le rôle du gène *NROB1* reste à éclaircir dans le développement testiculaire.

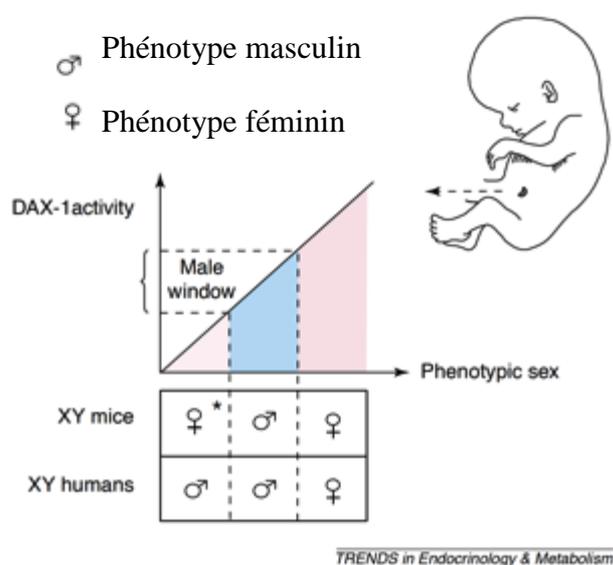


Figure 5. Modèle de l'activité pro-testiculaire de DAX1 en fonction de la gamme de concentration.

Chez les individus XY, le développement testiculaire se forme correctement si la dose et donc l'activité de DAX1 se situent dans une "fenêtre". Si l'activité de DAX1 augmente liée à une duplication du gène ou diminue suite à une mutation, le testicule ne se développera pas correctement. La "fenêtre" de développement masculin est représentée en bleu et la "fenêtre" de développement féminin en rose (d'après (Ludbrook and Harley, 2004)).

*e) DHH*

Le gène *DHH* (*desert hedgehog*) appartient à la famille de molécules de signalisation *hedgehog*. Il est exprimé chez la souris au niveau des cellules de soutien, uniquement dans les gonades des embryons XY à partir de 11.5 dpc juste après l'activation de *Sry*, puis ensuite dans les cellules de Sertoli (Bitgood et al., 1996). *DHH* se lie à son récepteur *PTCH1* (Patched 1), situé à la surface des cellules de Leydig et des cellules myoïdes péri-tubulaires. Les études chez la souris montrent que les souris mâles *Dhh*<sup>-/-</sup> présentent un phénotype masculin dans moins de 10% des cas. L'étude histologique des gonades chez les mâles *Dhh*<sup>-/-</sup> montre une désorganisation complète des tubes séminifères. Les gonades des souris adultes sont dépourvues de cellules de Leydig qui sont remplacées par des cellules fibroblastiques et il existe également une absence de lame basale entre les cellules myoïdes péri-tubulaires et les cellules de Sertoli (Clark et al., 2000). La voie *Dhh/Ptch1* joue un rôle dans la différenciation des cellules de Leydig par la régulation positive de l'expression de *Sfi* dans les cellules pré-Leydigienne de l'interstitium (Yao et al., 2002). Des mutations de *DHH* ont été rapportées chez l'homme en association avec des dysgénésies gonadiques partielles ou complètes à caryotype 46,XY (Canto et al., 2004, 2005; Castro et al., 2013; Paliwal et al., 2011; Umehara et al., 2000).

*f) DMRT1*

Le gène *DMRT1* (*dsx- and mab3 related transcription factor 1*) code pour une protéine appartenant à la famille des facteurs de transcription ayant un domaine de liaison à l'ADN très conservé, le domaine DM (Raymond et al., 2000). Les gènes ayant un domaine DM codent pour des facteurs de transcription impliqués dans le déterminisme sexuel dans différents organismes. Par exemple, le gène *DMRT1* est le déterminant majeur de la différenciation masculine chez le poulet tandis que *DMY* (*DMY protein*) l'est chez le poisson medaka (Matsuda et al., 2002; Smith et al., 2009). Chez l'homme, l'expression de *DMRT1* à partir de la 6<sup>ème</sup> semaine de développement est similaire à celle de *SRY*. En revanche, aucune expression n'est détectée dans la gonade féminine (Moniot et al., 2000). L'abolition de l'expression de *Dmrt1* chez la souris n'entraîne pas d'anomalie du développement sexuel ni du développement de la gonade suggérant que *DMRT1* n'est pas indispensable au déterminisme testiculaire chez les mammifères. En revanche, l'étude des gonades en postnatal montre une altération complète de l'architecture testiculaire avec des cellules de Sertoli incomplètement

différenciées (Raymond et al., 2000). Chez l'homme, les délétions du bras court du chromosome contenant le locus *DMRT1-3*, sont responsables de monosomie 9p associant une déficience intellectuelle ainsi que des malformations et, chez les sujets 46,XY, une dysgénésie gonadique responsable d'un spectre phénotypique large (Quinonez et al., 2013). Chez les fœtus 46,XX, aucune altération du développement ovarien ni de la fonction ovarienne n'est constaté (Vialard et al., 2002).

*DMRT1* joue un rôle en postnatal au niveau des cellules germinales. En effet, chez l'homme, il permet la prolifération des spermatogonies en empêchant leur entrée en méiose en inhibant la voie de l'acide rétinoïque et la transcription de *Stra8* (*stimulated by retinoic acid 8*) (Matson et al., 2010). Il semble également avoir un rôle dans le maintien de la différenciation testiculaire. Chez les souris *Dmrt1*<sup>-/-</sup>, les testicules des souris mutantes expriment le facteur pro-ovarien *Foxl2* (*forkhead box L2*) à quatre semaines de vie contrairement aux contrôles. De manière plus surprenante, le KO conditionnel de *Dmrt1* dans le testicule adulte fait que les cellules de Sertoli et de Leydig se trans-différencient en cellules de la granulosa et en cellules thécales avec une activation des gènes pro-ovariens dont *Foxl2*, avec une production d'œstrogènes et une « féminisation » des cellules germinales (Matson et al., 2011).

De nombreux facteurs sont impliqués dans le développement testiculaire, un schéma représentant les interactions entre ces différents facteurs est proposé dans la Figure 6.

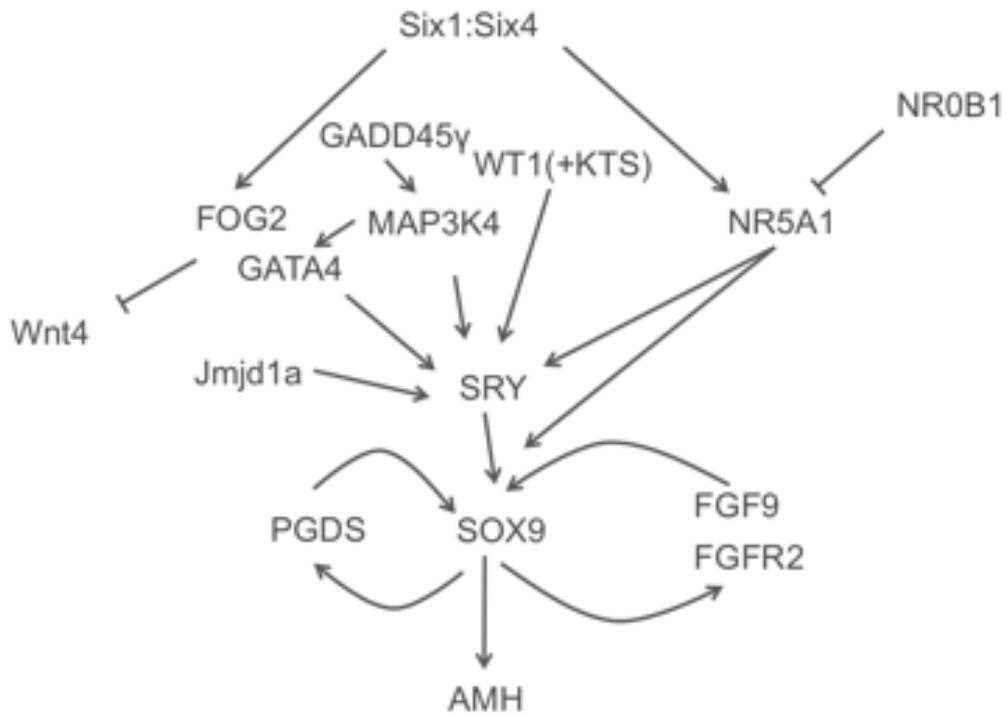


Figure 6. Représentation schématique des principaux facteurs impliqués dans le développement testiculaire.

### 3. Le développement ovarien

#### a) La voie de signalisation canonique *WNT/β-catenine*

Nous avons vu précédemment le rôle de la voie de signalisation WNT dans le développement de la gonade bi-potentielle, mais cette voie de signalisation est également impliquée dans le développement ovarien. Les gènes de la voie WNT codent pour des facteurs de croissance sécrétés. Leur action se fait par l'intermédiaire de leur fixation sur des récepteurs transmembranaires incluant les récepteurs FZ (Frizzled) et LRP6 (low density lipoprotein receptor-related protein 6). La fixation entraîne l'activation d'une cascade de signalisation impliquant CTNNB1 (catenin beta 1). Le mode d'action de la voie WNT est détaillé dans la Figure 7. En l'absence de ligand, CTNNB1 est phosphorylé puis ubiquitinylé conduisant à sa destruction par le protéasome. CTNNB1 est ainsi maintenu à un niveau faible dans le cytoplasme empêchant son action au niveau du noyau. En revanche, lorsqu'un ligand WNT se fixe sur son récepteur, il en découle un changement de conformation du récepteur à l'origine de la phosphorylation de LRP6. Ceci entraîne la stabilisation de CTNNB1 et son accumulation au sein du cytoplasme permettant ensuite son entrée dans le noyau pour former un complexe avec le facteur de transcription LEF/TCF à l'origine de l'initiation de l'expression de gènes cibles. Une de ces cibles est le gène *AXIN2* (*axin 2*) dont la protéine fait partie du complexe impliqué dans la dégradation de CTNNB1 permettant un rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation (Lustig et al., 2002). Par ailleurs, la R-spondine fait partie d'une des familles d'activateur de la voie WNT. Chez la souris, l'expression ectopique d'une forme stabilisée de β caténine bloque le processus normal de développement testiculaire et entraîne une réversion sexuelle dans le sens mâle-femelle (Maatouk et al., 2008).

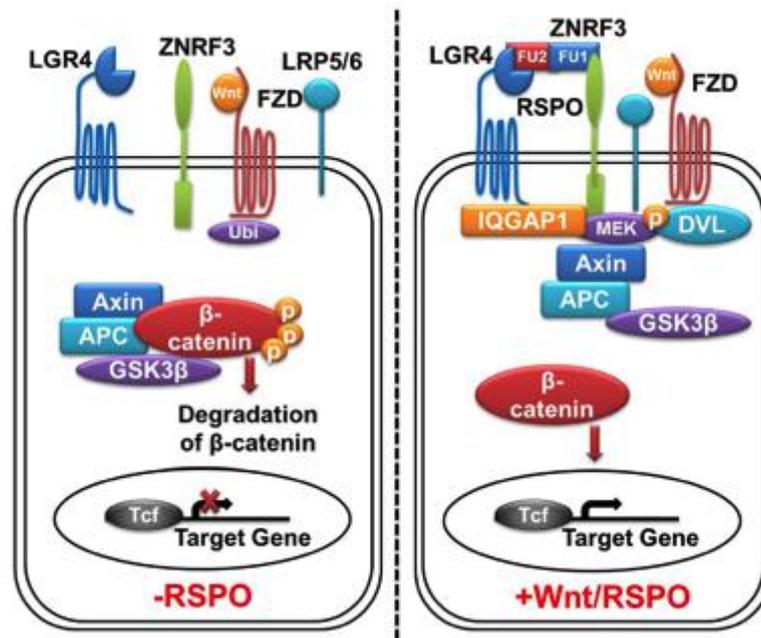


Figure 7. Schéma de la voie de signalisation WNT avec les protéines RSPO

En l'absence de protéine RSPO, les ubiquitines ligases E3 membranaires ZNRF3 ubiquitinent le récepteur FZD entraînant sa dégradation, la voie WNT n'est donc pas active. La  $\beta$ -caténine cytoplasmique est dégradé par le complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine empêchant sa translocation dans le noyau et empêchant la formation du complexe  $\beta$ -caténine/TCF et l'activation de la transcription des gènes cibles.

En présence de protéines RPSO, la fixation simultanée de LGR4 et ZNRF3 inhibe l'ubiquitination du récepteur FZD. Dans le même temps LGR4 recrute QGAP1 et augmente son affinité pour DVL menant à la formation d'un supercomplexe avec plusieurs membres de la voie WNT. Ceci permet l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme suivi de sa translocation dans le noyau et l'activation des gènes cibles de TCF.

LGR4, leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors 4 ; ZNRF3, zinc and ring finger 3 ; FZD, Frizzled class receptor ; Rspos, R-spondins ; LRP5/6, low-density lipoprotein receptor-related protein5/6 ; Ubi, ubiquitination ; DVL, disheveled.

**b) WNT4**

Nous avons vu que *WNT4* était exprimé dans la gonade des embryons XX et XY au moment de la formation de la gonade indifférenciée. Son expression diminue dans la gonade masculine au moment de sa différenciation tandis qu'elle persiste au niveau du mésonéphros et de l'ovaire en développement. Entre 12 et 18 semaines de développement, une expression modérée de *WNT4* est détectée au niveau des cellules de la pré-granulosa et de la granulosa tandis qu'au niveau des ovocytes l'expression est très faible. A partir de 19 semaines, l'expression de *WNT4* augmente fortement au niveau des ovocytes tandis qu'elle reste modérée au niveau des cellules de la granulosa (Jääskeläinen et al., 2010). Les souris XX *Wnt4*<sup>-/-</sup> présentent une réversion sexuelle partielle avec une masculinisation de la gonade qui apparaît ronde, dépourvue de capsule et associée à un aspect masculin de la partie proximale des canaux. Il existe par ailleurs une sécrétion de testostérone permettant le développement des canaux de Wolff, mais celle-ci est toutefois insuffisante pour permettre la masculinisation des organes génitaux externes. Il est décrit également une régression des canaux de Müller. Enfin, on note une diminution du nombre d'ovocytes chez ces mutants qui laisse penser que *Wnt4* est nécessaire au maintien du développement des cellules germinales. Cette diminution du nombre de cellules germinales s'accompagne d'une modification des cellules de soutien de la gonade qui adoptent des caractéristiques des cellules de Sertoli (Vainio et al., 1999). Chez l'homme, des mutations homozygotes de *WNT4* sont responsables du syndrome SERKAL (SEx Reversion, Kidneys, Adrenal and Lung dysgenesis). Ce syndrome létal associe un développement testiculaire chez des fœtus XX, des anomalies rénales et surrénaliennes et des anomalies pulmonaires (Mandel et al., 2008). Les mutations hétérozygotes de *WNT4* responsables d'une haploinsuffisance entraînent, elles, un phénotype proche de celui retrouvé chez les souris *KO* associant une absence d'utérus avec un excès d'androgènes (Biaison-Lauber, 2012). Au contraire, une surexpression de *Wnt4* entraîne des anomalies du développement de la vascularisation testiculaire et une inhibition de la synthèse de testostérone mais sans réversion sexuelle chez la souris tandis que chez l'homme, il a été retrouvé chez une femme 46,XY une duplication comprenant le gène *WNT4* (Jordan et al., 2001). Enfin, Bernard et al. ont montré que *Wnt4* était un antagoniste du développement testiculaire car il diminue l'expression de *Sox9* et de *Amh* en empêchant la fixation de SF1 sur *Tesco* (Bernard et al., 2012). Au total, *WNT4* est un acteur majeur du développement ovarien dont l'activité inhibe la voie d'expression de *SOX9* le déterminant majeur du développement testiculaire.

**c) *RSPO1***

Le gène *RSPO1* (*R-spondin 1*) appartient à une famille de protéines sécrétées contenant un domaine furin-like qui active la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine et ayant de nombreuses fonctions au cours du développement. Parma et al., en 2006, ont montré que *RSPO1* a une expression dimorphique. En effet, au moment de la différenciation de la gonade, chez les souris XX, *RSPO1* est exprimé uniquement au niveau de l'ovaire tandis qu'aucune expression n'est détectée au niveau du mésonéphros. En revanche, au même stade de développement, chez les souris XY, il n'est retrouvé qu'une expression au niveau de l'épithélium cœlomique (Parma et al., 2006). Les études chez les souris mutantes *RSPO1*<sup>-/-</sup> montrent un phénotype proche de celui retrouvé chez les souris *Wnt4*<sup>-/-</sup>. En effet les souris *RSPO1*<sup>-/-</sup> présentent la formation de vaisseaux cœlomique caractéristiques de la gonade masculine ainsi que la présence de cellules stéroïdogéniques fonctionnelles responsable de la persistance des canaux de Wolff. L'examen de la gonade de ces souris montre la présence à la fois de tubules séminifères dépourvus de cellules germinales et la présence de cellules de Sertoli et de Leydig. En revanche, ces souris n'ont pas d'anomalie utérine et surrénalienne du fait de l'absence d'expression de *Rspo1* dans ces deux tissus (Biaison-Lauber, 2012; Chassot et al., 2008a, 2008b). D'autres études ont montré que *Rspo1* est responsable de la stimulation de *Wnt4*. Par ailleurs, la surexpression de *Ctnnb1* et la stabilisation de la  $\beta$ -caténine est responsable du blocage des voies de signalisation du développement testiculaire (*Sox9/Fgf9*) responsable d'une réversion sexuelle chez les souris XY (Maatouk et al., 2008). Chez l'homme, des mutations perte de fonction homozygotes de *RSPO1* sont responsables d'un développement testiculaire chez des patients XX associé à une hyperkératose palmo-plantaire ainsi qu'une prédisposition aux carcinome spinocellulaire de la peau (Parma et al., 2006).

**d) *FOXL2***

Le gène *FOXL2* (*Forkhead box L2*) code pour un facteur de transcription appartenant à une famille de protéines conservées caractérisées par leur domaine de liaison à l'ADN *forkhead*. L'expression de *FOXL2* débute très tôt lors du développement ovarien Elle est détectable dès la 8<sup>ème</sup> - 9<sup>ème</sup> semaine de développement mais c'est au début du 2<sup>ème</sup> trimestre vers 14-15 semaines que l'expression est la plus forte. Les études par immunofluorescence montrent l'expression de *FOXL2* au niveau des cellules de soutien de la gonade, en particulier dans les cellules de la pré-granulosa et de la granulosa (Duffin et al., 2009). La suppression de

l'expression de *Foxl2* chez la souris est responsable d'une absence de formation de follicules ovariens et d'une infertilité mais sans anomalie de différenciation sexuelle (Uda, 2004). Cependant, l'étude de l'expression des facteurs masculins au niveau de la gonade montre une expression ectopique de SOX9 et FGFR2 dans certaines cellules, indiquant l'action antagoniste de FOXL2 et des facteurs de différenciation masculine lors du développement folliculaire (Ottolenghi, 2005). FOXL2 est donc nécessaire au développement des cellules de la granulosa. De la même façon que l'inactivation conditionnelle de *Dmrt1* dans le testicule de souris adulte entraîne une reprogrammation de la gonade vers l'ovaire, celle de *Foxl2* dans l'ovaire adulte aboutit aussi à une telle reprogrammation mais vers le testicule cette fois-ci, indiquant que l'action antagoniste des facteurs pro-testiculaires et pro-ovariens est un phénomène continu au cours de la vie (Uhlenhaut et al., 2009).

Chez la chèvre, le syndrome PIS (Polled Intersex Syndrome) associe l'absence de cornes chez les animaux homozygotes ou hétérozygotes pour une délétion de 11,7 kb située environ 300kb en amont du gène *Foxl2* et aboutissant à la perte d'expression de ce dernier et à l'arrêt de la transcription de trois longs ARNs non codants (Pailhoux et al., 2001). Chez les animaux homozygotes pour cette délétion, un état intersexué était également observé. Le rôle du gène *Foxl2* dans ce phénotype fut ensuite confirmé par l'inactivation du gène chez la chèvre montrant que les individus XX *Foxl2*<sup>-/-</sup> présentaient une réversion sexuelle dans le sens femelle-mâle, faisant de ce dernier un gène majeur du déterminisme ovarien (Boulanger et al., 2014). Chez l'humain, les mutations de *FOXL2* sont responsables du syndrome BPES (Blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus). Les patients présentent des anomalies du développement des paupières responsables d'un blépharophimosis, un ptosis et un épicanthus. Chez les femmes, une IOP peut s'associer à ces signes oculaires dans le BPES de type I ou non dans le BPES de type II (Bell et al., 2001; Crisponi et al., 2001; De Baere, 2001).

#### e) ***FST***

Le gène *FST* (*follistatin*) code pour une protéine modulant l'action des activines et des inhibines qui appartiennent à la famille des TGFβ (transforming growth factor β). Chez la souris, la follistatine est exprimée uniquement dans l'ovaire en développement à partir de 11,5 dpc directement après l'expression de *Wnt4*, et selon le même profil d'expression au niveau des cellules somatiques (Yao et al., 2004). L'étude de l'expression de la follistatine chez les souris invalidées pour *Wnt4* montre une absence totale d'expression de *Fst* tandis que

les souris *Fst*<sup>-/-</sup> n'ont pas d'altération de l'expression de *Wnt4* confirmant l'activation de *FST* en aval de *WNT4* (Yao et al., 2004). Plus récemment, Kashimada et al. ont montré le rôle de *FOXL2* dans le maintien de l'expression de *FST* proposant un schéma de co-régulation de l'expression de *FST* par *WNT4* puis par *FOXL2* (Kashimada et al., 2011). L'examen des gonades chez les souris XX *Fst*<sup>-/-</sup> révèle la présence de vaisseaux cœlomiques à la surface de la gonade à 12,5 dpc, ainsi qu'une apoptose massive des cellules germinales à 16,5 dpc responsable d'une perte complète des cellules germinales à la naissance, identique à celle retrouvée chez les souris *Wnt4*<sup>-/-</sup>. Le rôle de *Fst* serait donc d'inhiber la formation des vaisseaux cœlomiques présents chez les mâles et de permettre la survie des cellules germinales dans le cortex ovarien.

Au total, de nombreux facteurs sont impliqués dans le développement des gonades masculines (Figure 6) et féminines (Figure 8). Le développement gonadique se fait grâce à l'expression de ces facteurs à un instant précis du développement gonadique, les facteurs pro-testiculaires ayant une expression plus précoce que les facteurs pro-ovariens mais ces facteurs s'antagonisent tout au long du processus de développement gonadique permettant un développement gonadique correct selon le programme établi. C'est pourquoi, tout excès d'un facteur ou déficience d'un autre facteur va entraîner un déséquilibre dans la balance et entraîner la survenue d'une anomalie du développement sexuel.

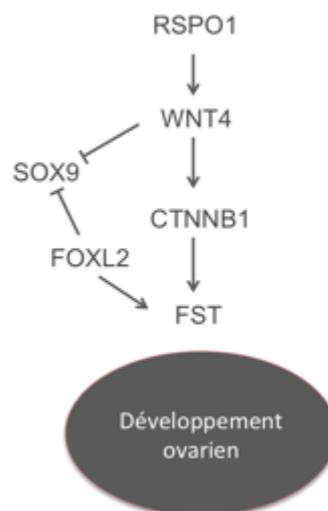


Figure 8. Schéma récapitulatif des facteurs impliqués dans le développement gonadique ovarien.

### C. Anomalies du développement sexuel

Les anomalies du développement sexuel (DSD - Disorders of Sex Development) correspondent aux situations où il existe une discordance entre le sexe génétique, le sexe gonadique et le sexe phénotypique. Pendant de nombreuses années différents termes ont été utilisés pour désigner ces situations : hermaphrodisme vrai, pseudohermaphrodisme masculin ou féminin et bien d'autres encore. En 2005 ; les avancées dans le diagnostic, la prise en charge et le suivi à long terme des patients ont poussé différents groupes d'experts à établir un consensus pour la prise en charge de ces patients (Hughes et al., 2006). Une nouvelle nomenclature a été proposée afin de faciliter la description des différentes situations (Tableau 2).

Tableau 2. Proposition de nouvelle nomenclature pour les anomalies du développement sexuel (Hughes et al., 2006)

Previous	Proposed
<b>Intersex</b>	<b>Disorders of sex development (DSD)</b>
Male pseudohermaphrodite Undervirilisation of an XY male Undermasculinisation of an XY male	46,XY DSD
Female pseudohermaphrodite Overvirilisation of an XX female Masculinisation of an XX female	46,XX DSD
True hermaphrodite	Ovotesticular DSD
XX male or XX sex reversal	46,XX testicular DSD
XY sex reversal	46,XY complete gonadal dysgenesis

A partir de cette nomenclature, une classification reposant sur le résultat du caryotype a été établie (Tableau 3). La première catégorie regroupe les DSD liés à une anomalie des chromosomes sexuels. Elle inclut le Syndrome de Turner, le Syndrome de Klinefelter, les dysgénésies gonadiques mixtes 45,X/46,XY et les chimerismes 46,XX/46,XY. Les deux autres catégories concernent les DSD à caryotype 46,XY et 46,XX et sont classés en trois sous-catégories : A) les anomalies du déterminisme gonadique, B) les anomalies de la synthèse ou de l'action des androgènes, C) les autres DSD ne rentrant pas dans les deux sous-catégories précédentes.

Tableau 3. Proposition de classification des DSD (Hughes et al., 2006)

Sex chromosome DSD	46,XY DSD	46,XX DSD
(A) 45,X (Turner syndrome and variants)	(A) Disorders of gonadal (testicular) development 1. Complete gonadal dysgenesis (Swyer syndrome)	(A) Disorders of gonadal (ovarian) development 1. Ovotesticular DSD 2. Testicular DSD (eg, SRY+, dup SOX9) 3. Gonadal dysgenesis
(B) 47,XXY (Klinefelter syndrome and variants)	2. Partial gonadal dysgenesis 3. Gonadal regression 4. Ovotesticular DSD	
(C) 45,X/46,XY (mixed gonadal dysgenesis, ovotesticular DSD)	(B) Disorders in androgen synthesis or action 1. Androgen biosynthesis defect (eg, 17-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency, 5 $\alpha$ -reductase deficiency, StAR mutations) 2. Defect in androgen action (eg, CAIS, PAIS) 3. LH receptor defects (eg, Leydig cell hypoplasia, aplasia) 4. Disorders of AMH and AMH receptor (persistent mullerian duct syndrome)	(B) Androgen excess 1. Fetal (eg, 21-hydroxylase deficiency, 11-hydroxylase deficiency) 2. Fetoplacental (aromatase deficiency, POR) 3. Maternal (luteoma, exogenous, etc)
(D) 46,XX/46,XY (chimeric, ovotesticular DSD)	(C) Other (eg, severe hypospadias, cloacal extrophy)	(C) Other (eg, cloacal extrophy, vaginal atresia, MURCS, other syndromes)

While consideration of karyotype is useful for classification, unnecessary reference to karyotype should be avoided; ideally, a system based on descriptive terms (for example, androgen insensitivity syndrome) should be used wherever possible.  
AMH, anti-mullerian hormone; CAIS, complete androgen insensitivity syndrome; DSD, disorders of sex development; MURCS, mullerian, renal, cervicothoracic somite abnormalities; PAIS, partial androgen insensitivity syndrome; POR, cytochrome P450 oxidoreductase.

## 1. DSD 46,XY : anomalie du déterminisme testiculaire

Les DSD 46,XY avec une dysgénésie gonadique complète (CGD) ont une absence de développement testiculaire. Le testicule est remplacé par une bandelette fibreuse ou une gonade dysgénétique ne produisant ni AMH, ni testostérone. Cliniquement, les patientes ont des organes génitaux externes féminins sans anomalie et des voies génitales féminines qui sont présentes (utérus et trompes). Les patientes viennent consulter car elles présentent une aménorrhée primaire. Le caryotype réalisé au cours du bilan montre une formule 46,XY.

Dans le cas des DSD 46,XY avec une dysgénésie gonadique partielle (PGD), le diagnostic est fait en période néonatale chez des enfants présentant un phénotype ambigu qui peut être très variable d'un enfant à l'autre en fonction de la quantité de testostérone produite par le testicule au moment de la différenciation sexuelle. A l'examen clinique, on peut retrouver un hypospadias plus ou moins sévère, un micropénis ou des anomalies du scrotum. Concernant les voies génitales, les patients peuvent avoir ou non une persistance des canaux de Müller liée à une sécrétion insuffisante d'AMH par les cellules de Sertoli

Tous les gènes dont nous avons vu précédemment l'implication dans le développement de la gonade bi-potentielle ou dans le développement du testicule peuvent être impliqués dans les cas de DSD 46,XY avec CGD ou PGD. Cependant, la cause génétique n'est retrouvée que dans environ la moitié des cas.

Le gène le plus fréquemment impliqué dans les dysgénésies gonadiques 46,XY est le gène *SRY*. Des mutations perte de fonction sont retrouvées dans 10 à 15% des cas de CGD (Hawkins et al., 1992; Veitia et al., 1997). Le gène *NR5A1* est responsable de 10 à 15% des cas de PGD (El-Khairi and Achermann, 2012) et de rares cas de CGD. Le troisième gène le plus fréquemment impliqué est le gène *MAP3K1*. Il appartient à la famille des MAPK comme le gène *Map3k4* dont nous avons vu l'implication dans le développement du testicule chez la souris. Les mutations identifiées dans le gène *MAP3K1* sont des mutations gain de fonction. Elles entraînent une phosphorylation de ses cibles et en particulier p38 et ERK1/2 (mitogen-activated protein kinase 3/mitogen-activated protein kinase 1) responsable d'une augmentation de la fixation des co-facteurs qui sont RHOA (ras homolog family member A), MAP3K4, FRAT1 (frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1 ) et AXIN1 (Baxter et al., 2015). Ceci est responsable d'une altération des facteurs de la voie de déterminisme masculin

associé à une augmentation des facteurs de la voie du déterminisme féminin comme *CTNNB1* et *FOXL2*. D'autres gènes sont impliqués dans les cas de DSD 46,XY, ils peuvent être responsables de DSD syndromiques ou non (Tableau 4).

Par ailleurs, il a été décrit des cas de DSD 46,XY avec PGD ou CGD chez des patients ayant un réarrangement non pas au niveau de la séquence codante du gène mais dans les régions régulatrices. Nous avons vu le rôle de *Tesco* dans le développement testiculaire chez la souris mais son implication chez l'homme n'a pas encore été rapportée. L'existence d'une autre région régulatrice spécifique de la gonade chez l'homme avait été évoquée. Benko et al. ont rapporté en 2011, deux cas familiaux de patients ayant une délétion en amont de *SOX9* à environ 500kb (Benko et al., 2011).

Tableau 4. Gènes impliqués dans les DSD 46,XY avec CGD ou PGD.

	Gène	Locus	Mode de transmission	Phénotype	Fréquence
Non syndromique	<i>SRY</i>	Yp11.3	Y	CGD (ou PGD)	10-15%
	<i>MAP3K1</i>	5q11.2	AD	CGD ou PGD	13-18%
	<i>NR5A1</i>	9q33	AD	PGD (ouCGD)	10-15%
	<i>NROB1</i>	Xp21.3	RLX (duplication)	CGD	Rare
	<i>DMRT1</i>	9p24.3	AD (délétion)	CGD (ou PGD)	Rare
	<i>CBX2</i>	17q25.3	AR	Développement ovarien	Rare
	<i>DHH</i>	12q13.1	AR/AD	CGD ou PGD	Rare
Syndromique	<i>WT1</i>	11p13	AD	Syndrome de Frasier ; Syndrome de Denys-Drash ; Syndrome WAGR	Rare
	<i>GATA4</i>	8p23.1	AD	Malformation cardiaque, anomalies testiculaires	Rare
	<i>SOX9</i>	17q24.3	AD	Dysplasie campomélique, CGD ou PGD	Rare
	<i>ATRX</i>	Xp21.1	RLX	Alpha-thalassémie, retard mental lié à l'X, PGD ou CGD	Rare
	<i>ARX</i>	Xp21.3	RLX	Lissencéphalie, CGD ou PGD	Rare
	<i>DHCR7</i>	11q13.4	AR	Syndrome de Smith-Lemli- Opitz	Rare
	<i>WNT4</i>	1p36.12	Duplication	PGD ou CGD syndromique	Rare

## 2. DSD 46,XX : anomalie du déterminisme ovarien

La fréquence des DSD 46,XX avec un développement testiculaire est estimé à 1/20.000 environ. Ils peuvent être classés en trois catégories selon la présentation clinique : 1) les patients ayant un développement masculin sans anomalies des organes génitaux externes ni des voies génitales, 2) les patients XX avec une ambiguïté des organes génitaux externes, 3) les patients ayant un développement ovotesticulaire. (McElreavey et al., 1993). Dans ces trois groupes, la fréquence des anomalies moléculaires retrouvées est très différente. Les patients ayant un développement masculin sans anomalie sont les plus fréquents. Ils représentent environ 85% des cas de DSD 46,XX avec un développement testiculaire. Le diagnostic est le plus souvent fait à l'âge adulte car les patients présentent une infertilité due à une azoospermie. Dans 80 à 90% des cas, les patients sont porteurs du gène *SRY* à l'extrémité du bras court du chromosome X du fait d'une recombinaison inégale au cours de la méiose paternelle (McElreavey et al., 1993; Zenteno-Ruiz et al., 2001). Dans 15% des cas de DSD 46,XX testiculaire ou ovotesticulaire, le diagnostic est fait en période néonatale devant la présence d'organes génitaux externes ambigus. Dans ces cas-là, le locus *SRY* n'est présent que chez 15% des patients.

La présence du locus *SRY* chez les patients 46,XX avec un développement testiculaire a longtemps été la seule cause génétique identifiable. Ce n'est que 15 ans plus tard qu'une autre cause de DSD 46,XX avec développement testiculaire a été identifiée. Le gène *RSPO1* a été impliqué dans un syndrome associant une dyskératose palmo-plantaire, la survenue de cancer spino-cellulaire associées à un développement testiculaire chez des sujets 46,XX (Parma et al., 2006).

L'implication du gène *WNT4* dans le développement ovarien chez l'homme a été démontrée grâce à l'étude de patients présentant une duplication de *WNT4* associé à une réversion sexuelle chez des sujets XY. Ceci a permis de montrer que la voie *WNT* est un déterminant positif du déterminisme ovarien (Jordan et al., 2001). Comme nous l'avons vu précédemment, les mutations homozygotes de *WNT4* chez les patients 46,XX sont responsables du syndrome SERKAL, tandis que les mutations hétérozygotes sont responsables d'un syndrome associant une agénésie müllérienne avec hypersécrétion de testostérone mais sans développement testiculaire. Les patientes ont un phénotype féminin.

Au total, jusqu'à la fin des années 2000, seul le gène *SRY* était identifié dans les cas de DSD 46,XX avec un développement testiculaire sans anomalie des organes génitaux externes.

En 2011, plusieurs publications ont rapporté des cas de DSD 46,XX avec un développement testiculaire et qui présentaient une duplication située dans un désert génique, en amont du gène *SOX9* (Benko et al., 2011; Cox et al., 2011; Vetro et al., 2011). Toutes les duplications identifiées chez ces patients avaient une région minimale commune de 78 kb et nommée *RevSex*. Cette région est située à environ 550 kb en amont de *SOX9* (Figure 9). Comme nous l'avons vu, le gène *SOX9* est exprimé dans différents tissus au cours du développement embryonnaire. Des études ont montré que *SOX9* était régulé par de nombreux *enhancers* qui étaient tissus spécifiques. Ces *enhancers* se situent aussi bien en 5' qu'en 3' du gène et sont situés pour certains à plus de 1 Mb en amont de *SOX9* (Bagheri-Fam et al., 2006; Benko et al., 2009). L'ensemble de ces données suggère que la région *RevSex* contiendrait l'*enhancer* spécifique de l'expression de *SOX9* dans la gonade.

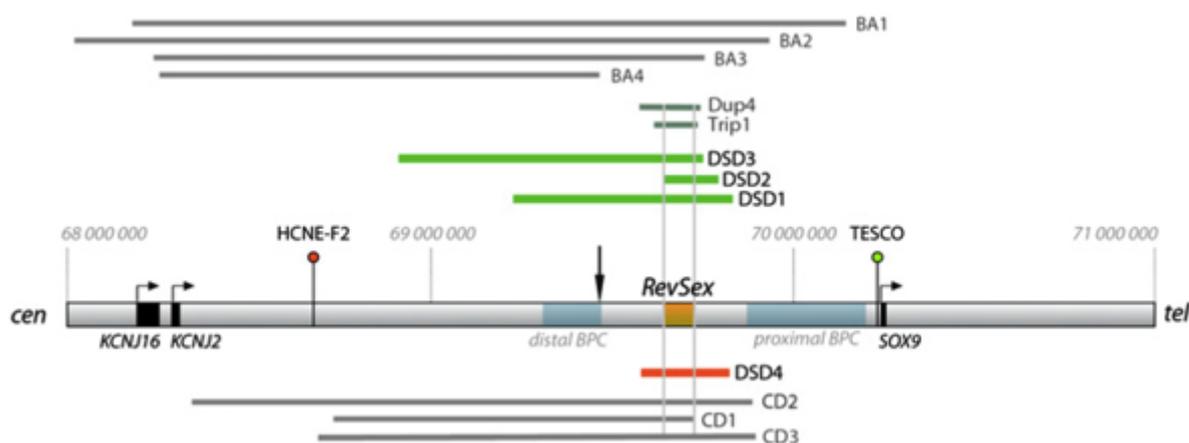


Figure 9. Schéma de la région *RevSex* identifiée par Benko et al. (Benko et al., 2011).

Les réarrangements dans le désert génique en amont de *SOX9* sont associés à des DSD 46,XX et DSD 46,XY. La région autour de *SOX9* est représentée en gris, les gènes sont représentés par des barres noires. Les gains de copies associés aux DSD 46,XX sont représentés au-dessus et les délétions associées aux DSD 46,XY sont représentées en-dessous. La région minimale commune de 78 kb est représentée en jaune.

Tableau 5. Gènes et régions régulatrices impliqués dans les DSD 46,XX avec développement testiculaire ou ovotesticulaire

	Gène ou région	Locus	Mode de transmission	Phénotype	Fréquence
Gènes	<i>SRY</i>	Yp11.3	Translocation Y déséquilibrée	Développement testiculaire	80%
	<i>SOX9</i>	17q24.3	Duplication	Développement testiculaire	Rare
	<i>RSPO1</i>	1p34.3	AR	Hyperkératose palmo-plantaire, carcinome spino-cellulaire, développement testiculaire	Rare
	<i>SOX10</i>	22q13.1	Duplication	Développement testiculaire ou ovotesticulaire	Rare
	<i>SOX3</i>	Xq27.1	Duplication	Développement testiculaire	Rare
	<i>WNT4</i>	1p36.12	AR AD	Syndrome SERKAL; Aplasie Müllérienne, Hyperandrogénie	Rare
Régions régulatrices	<i>En amont SOX3</i>	Xq27.1	Délétion	Développement testiculaire	Rare
	<i>En amont SOX9</i>	17q24.3	Duplication	Développement testiculaire	10%

## **D. Développement folliculaire**

Le follicule ovarien est l'unité fonctionnelle du système reproductif féminin. Il est constitué d'une seule cellule germinale, l'ovocyte, entouré par des cellules somatiques de soutien : les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque. Le développement folliculaire qui reprend à la puberté permet d'aboutir à la maturation puis à l'expulsion de l'ovocyte.

### **1. Les follicules primordiaux**

Comme nous l'avons vu, les follicules primordiaux se forment durant la vie fœtale chez la femme lors du développement de l'ovaire. Le pool de réserve des follicules primordiaux est définitivement constitué au moment de la naissance avec la présence d'environ 1 à 2 millions de follicules primordiaux. L'assemblage des cellules folliculaires autour des ovocytes est une étape cruciale conditionnant la fertilité future de la femme.

### **2. Le développement folliculaire**

Le développement folliculaire ou folliculogénèse correspond à l'ensemble des processus de croissance et de maturation depuis le stade de follicule primordial jusqu'à l'ovulation. C'est un processus continu au cours duquel, l'ovocyte va croître et les cellules de soutien vont se développer.

La folliculogénèse commence par la modification de l'épithélium du follicule primordial qui devient un épithélium cubique ou prismatique, on parle alors de follicule primaire qui possède une taille de 45 à 50  $\mu\text{m}$ . Dans le même temps apparaît une couche de glycoprotéine entre l'ovocyte toujours en croissance et les cellules granuleuses appelée zone pellucide. Plusieurs follicules primordiaux vont pouvoir s'activer et se transformer en follicules primaires mais seuls quelques follicules primaires vont évoluer vers le stade de follicule secondaire. L'épithélium cubique du follicule primaire va s'épaissir et devenir un épithélium pluristratifié pour former la couche granuleuse. Une membrane basale, ou membrane de Slavjansky, se forme autour de la couche granuleuse et les cellules du stroma ovarien environnant commencent à former la thèque du follicule à l'origine de la sécrétion des androgènes. A ce stade, le follicule secondaire mesure entre 50 et 180  $\mu\text{m}$ . De petites lacunes de liquide vont apparaître au sein de la couche granuleuse formant le follicule pré-antral puis la fusion de ces lacunes va former l'antrum ou cavité folliculaire. L'ovocyte est repoussé en

périphérie et fait sailli dans l'antrum au sommet d'un amas de cellules granuleuses appelé cumulus oophorus. Il est recouvert d'une seule couche de cellules granuleuses, la corona radiata. En périphérie, la thèque est alors formée de deux couches : la thèque interne constituée de cellules et richement vascularisée et la thèque externe formée principalement de tissu conjonctif. Jusqu'à ce stade, la croissance du follicule se fait indépendamment de la FSH (follicle stimulating hormone). En revanche, à partir du stade de follicule pré-antral/antral, la croissance folliculaire passe sous la dépendance de la FSH. Cette croissance est principalement liée à l'accroissement du volume de l'antrum. La majorité des follicules n'atteint pas le stade pré-ovulatoire, l'ovulation correspondant en réalité à un évènement exceptionnel (0,1% des follicules vont jusqu'à l'étape de l'ovulation) (Figure 10).

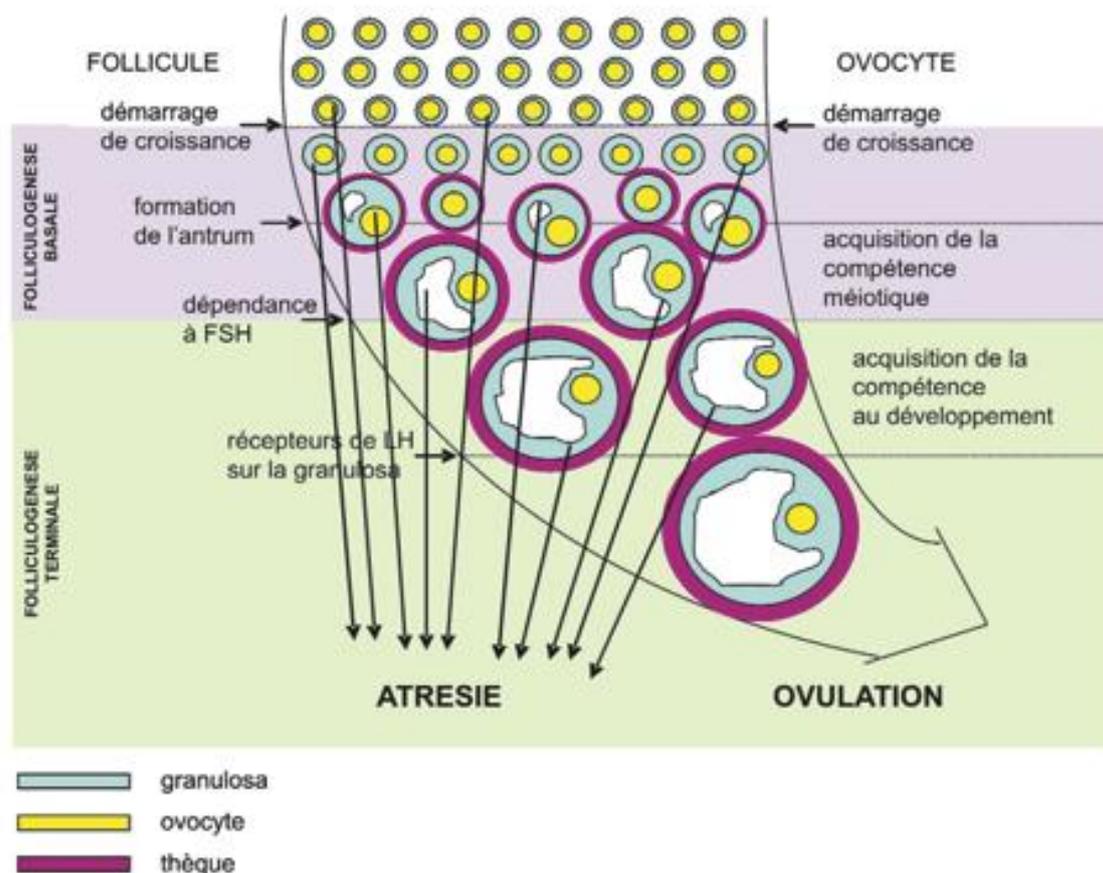


Figure 10. Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire d'après Monniaux et al. (Monniaux et al., 2009).

## **E. Facteurs génétiques de la folliculogénèse**

La formation des follicules primordiaux dépend de la présence des cellules germinales et de l'interaction de celles-ci avec les cellules somatiques de soutien par l'intermédiaire de signaux paracrines. Pour se former, les amas de PGCs vont devoir se rompre pour laisser la place à des cellules germinales individualisées qui vont être entourées par une couche uni-stratifiée de cellules de soutien. En l'absence de cellules germinales, les follicules primordiaux ne se forment pas montrant l'importance de l'interaction entre les cellules germinales et les cellules de soutien environnantes pour la mise en place du follicule primordial (Guigon and Magre, 2006; Guigon et al., 2005).

### **1. Formation des follicules primordiaux**

#### **a) Voies de signalisations Notch et Kitl/Kit**

La voie de signalisation Notch est impliquée dans la mise en place des follicules primordiaux. En effet, elle est impliquée dans la rupture des amas de PGCs. Les ligands de la voie Notch, JAGGED1 et JAGGED2 sont exprimés au niveau des cellules germinales tandis que les récepteurs NOTCH1 et NOTCH2 sont exprimés dans les cellules de la pré-granulosa. La délétion conditionnelle du gène *Jag1* au niveau des cellules germinales ou de *Notch2* dans les cellules de la granulosa chez la souris est responsable d'une formation anormale des follicules primordiaux. On observe soit des follicules contenant de nombreux ovocytes indiquant un échec de fragmentation des amas ovocytaires au moment de la formation des follicules ou bien la présence de pseudo-follicules contenant de grands ovocytes mais dépourvus de cellules de soutien (Vanorny et al., 2014; Xu and Gridley, 2013). La coopération des cellules de soutien et des cellules germinales pour la formation des follicules primordiaux se fait par l'intermédiaire de la voie de signalisation Notch.

De la même manière, le récepteur KIT de la voie de signalisation Kit/Kitl est exprimé au niveau des ovocytes tandis que KITL est produit principalement par les cellules de la granulosa. L'inhibition de l'expression de KIT dans des cultures d'ovaires est responsable d'une diminution de la fragmentation des amas ovocytaires et d'une diminution de l'apoptose des ovocytes. Cet effet de la voie KITL/KIT semble être médié par la voie des MAPK (Jones and Pepling, 2013).

L'interaction entre les cellules de la granulosa et les cellules germinales se fait donc de manière bi-directionnelle.

**b) SOHLH1 et SOHLH2**

Les gènes *SOHLH1* (*spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1*) et *SOHLH2* (*spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2*) codent pour des facteurs de transcription ayant un domaine bHLH (*basic helix-loop-helix*) exprimés spécifiquement dans les cellules germinales masculines et féminines avant l'apparition des follicules primordiaux et dans les ovocytes des follicules primordiaux (Choi et al., 2008a; Zhang et al., 2015). Les modèles de souris *KO* pour *Sohlh1* ou *Sohlh2* montrent des anomalies du développement folliculaire similaires associant une perte totale des follicules à trois semaines de vie par défaut de prolifération des cellules de la pré-granulosa. Ces anomalies sont liées à la diminution de l'expression de gènes impliqués dans le développement folliculaire tels que *Nobox* (*NOBOX oogenesis homeobox*), *Figla* (*folliculogenesis specific bHLH transcription factor*) et *Lhx8* (*LIM homeobox 8*) suggérant que *Sohlh1* et *Sohlh2* sont situés en amont de ces gènes (Choi et al., 2008a; Pangas et al., 2006). Plus récemment, il a été montré que *SOHLH1* et *SOHLH2* coopèrent pour inhiber l'expression de *STRA8* dans les cellules germinales au stade de prophase I de méiose dans les spermatogonies (Desimio et al., 2015). Au total, *SOHLH1* et *SOHLH2* jouent un rôle important dans la régulation de la folliculogénèse en régulant de nombreux facteurs nécessaires à son déroulement. Des variations dans ces deux gènes ont été rapportées chez des patientes présentant une IOP (Qin et al., 2014; Zhao et al., 2015).

**c) FIGLA**

Le gène *FIGLA* (*folliculogenesis specific bHLH transcription factor*) codant pour un facteur de transcription joue un rôle important dans la mise en place des follicules primordiaux. Chez la souris, son expression apparaît au niveau des gonades après la différenciation en gonade féminine, au moment où les cellules germinales entrent en méiose. Cette expression est détectée, uniquement, au niveau des ovocytes. L'étude de souris *KO* *Figalpha*<sup>-/-</sup> montre que ces souris ont un développement gonadique normal mais les ovaires à la naissance sont dépourvus de follicules primordiaux donnant un aspect « ratatiné » à ces ovaires (Soyal et al., 2000). Les follicules primordiaux ne se forment pas car les cellules de

soutien n'adhèrent pas à l'ovocyte et donc ne peuvent l'entourer menant à une atresie prématurée. Dans le même temps, l'ovocyte ne grossit pas et ne progresse pas jusqu'au stade diplotène. Chez l'humain, une étude de l'expression des gènes au niveau des follicules primordiaux montre une forte augmentation de l'expression de *FIGLA* et l'étude de ce gène chez des patientes présentant une IOP a montré la présence de mutations altérant la fonction de la protéine (Fowler et al., 2009; Zhao et al., 2008).

#### d) **NOBOX**

Le gène *NOBOX* (*NOBOX oogenesis homeobox*) code pour un facteur de transcription ayant un domaine à homeobox permettant sa fixation à l'ADN. L'expression de *Nobox* est détectable précocement dans les ovogonies et persiste dans l'ovocyte tout au long de la folliculogénèse (Suzumori et al., 2002). Plus récemment, Bouilly et al. ont montré que *NOBOX* était également exprimé dans les cellules de la granulosa au cours du développement folliculaire et qu'il était capable d'interagir avec *FOXL2* (Bouilly et al., 2014). Des études réalisées *in vitro* ont montré que *NOBOX* pouvait se lier aux promoteurs de *Pou5f1* (*POU class 5 homeobox 1*) et *Gdf9* (*growth differentiation factor 9*) indiquant son rôle direct dans la régulation de ces gènes au cours de la folliculogénèse (Choi and Rajkovic, 2006). *NOBOX* joue un rôle dans la mise en place du follicule primordiale, en effet les souris *KO* pour *Nobox* présentent un défaut de dissociation des amas de cellules germinales empêchant la formation de follicules primordiaux (Lechowska et al., 2011). *NOBOX* a également été impliqué dans l'activation folliculaire puisque les souris déficiente pour *Nobox* présentent un défaut d'activation et de développement des follicules primordiaux responsable d'une accélération de la perte ovocytaire (Rajkovic et al., 2004). L'étude de l'expression des gènes montre que *Gdf9* et *Pou5f1* sont réprimés chez ces souris. L'étude du gène *NOBOX* chez des patientes présentant une IOP a permis de mettre en évidence des mutations qui altèrent la fonction de la protéine *NOBOX* (Bouilly et al., 2015).

**e) FOXL2**

*FOXL2*, comme nous l'avons vu précédemment, est un déterminant majeur de la différenciation féminine de la gonade mais il est également indispensable au développement folliculaire. Lors du développement folliculaire chez la souris, *Foxl2* est exprimé au niveau des cellules de soutien puis dans les cellules de la granulosa tout au long de la folliculogénèse. L'abolition de *FOXL2* chez la souris entraîne un défaut de formation des follicules lié à la persistance des amas d'ovogonies et d'un défaut d'englobement des ovogonies par les cellules de la granulosa. *FOXL2* est également impliqué dans l'activation folliculaire. En effet, lorsque les follicules primordiaux ont pu se former, les cellules de la granulosa ne se transforment pas en cellules cuboïdes bloquant le follicule au stade primordial. responsable d'une atrésie prématurée (Uda, 2004). Ces résultats sont en accord avec le phénotype retrouvé chez l'humain, comme nous l'avons vu précédemment, *FOXL2* est responsable du syndrome BPES qui associe dans le type I une IOP (Bell et al., 2001; De Baere, 2001).

*FOXL2* est donc un élément majeur du fonctionnement ovarien mais il garde également son rôle de principal facteur du déterminisme de l'ovaire puisque son inactivation conditionnelle dans la gonade adulte aboutit à des signes de trans-différenciation vers le testicule (Uhlenhaut et al., 2009).

**f) Acide rétinoïque**

Les précurseurs des cellules de la granulosa contrôlent le développement ovarien en favorisant la différenciation des cellules de la thèque ainsi qu'en régulant l'entrée en méiose des cellules germinales (Lin and Capel, 2015). En effet, les cellules de soutien de l'ovaire en développement (à la différence des cellules de soutien au niveau testiculaire) expriment très peu l'enzyme CYP26B1 (cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1) responsable de la dégradation de l'acide rétinoïque sécrétée par le mésonéphros adjacent. De ce fait, l'acide rétinoïque peut alors se fixer sur ses récepteurs situés au niveau des cellules germinales XX permettant l'activation de ses cibles et l'entrée en méiose de celles-ci. L'une des cibles de l'acide rétinoïque est le gène *STRA8* et son expression au niveau de la gonade féminine est un marqueur précoce d'entrée en méiose (Childs et al., 2011; Naillat et al., 2010). Cependant, l'acide rétinoïque n'est pas le seul facteur responsable de l'entrée en méiose des cellules germinales, la voie WNT/ $\beta$ -caténine est également impliquée. En effet, Chassot et al. ont

montré, en 2011, le rôle de *WNT4* et *RSPO1* dans la prolifération et l'entrée en méiose des cellules germinales (Chassot et al., 2011; Naillat et al., 2010).

## 2. Régulation du pool de follicules primordiaux

Le nombre d'ovocytes décroît fortement dans les derniers mois de développement au cours de la formation des follicules primordiaux du fait de l'entrée en apoptose des ovocytes. L'apoptose des cellules germinales est un processus normal au cours du développement folliculaire. Ce processus est sous la dépendance de l'action de facteurs anti-apoptotiques comme BCL2 (BCL2, apoptosis regulator) et BCLX (BCL2 like 1) et de facteurs pro-apoptotiques tels que BAX (BCL2 associated X, apoptosis regulator) ou la voie des Caspases (Perez et al., 1999; Rucker et al., 2000).

## 3. Croissance folliculaire

### a) Famille du TGF- $\beta$ : *GDF9* et *BMP15*

La famille du TGF- $\beta$  est composée d'une trentaine de membres que l'on retrouve dans tout le règne animal, dont les TGF- $\beta$ s, les activines et les BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*). Ces cytokines jouent un rôle primordial dans la détermination du devenir cellulaire au cours de l'embryogenèse et contrôlent un large spectre de réponses biologiques chez l'adulte (Roberts, 1998).

GDF9 (growth differentiation factor 9) appartient à la famille du TGF- $\beta$ . Au cours de la folliculogénèse, il est synthétisé par l'ovocyte et permet le développement des cellules de la granulosa. L'étude des souris *KO* pour *Gdf9* montre une infertilité complète chez les souris femelles XX. L'étude histologique des gonades de ces souris montre un blocage du développement folliculaire au stade de follicule primaire. Par ailleurs, l'acquisition de la compétence méiotique de l'ovocyte est également altérée chez ces souris *KO* (Dong et al., 1996). Le gène *GDF9* a également été impliqué chez l'homme dans le développement ovarien. En effet, différentes mutations du gène *GDF9* ont été rapportées chez des femmes présentant une IOP (Laissue et al., 2006; Qin et al., 2015).

Un autre membre de la famille du TGF- $\beta$  a été impliqué dans le développement du follicule ovarien, le gène *BMP15* (*bone morphogenetic protein 15*). Il est exprimé dans

l'ovocyte à partir du stade de follicule primaire chez l'humain. A la différence des souris *KO Gdf9* qui sont totalement infertiles, les souris *KO Bmp15* sont partiellement fertiles, mais le nombre de portées et le nombre d'individus par portée est diminué. Ceci est conforté par l'étude histologique des gonades qui montre une taille normale de celles-ci mais un nombre de follicules diminué (Yan et al., 2001). Le facteur BMP15 est impliqué dans la croissance et la maturation du follicule depuis le stade de follicule primaire. Il régule la sensibilité des cellules de la granulosa à la FSH et prévient l'apoptose de celles-ci. Enfin, comme GDF9, il est impliqué dans le développement méiotique ovocytaire (Persani et al., 2014). De nombreux variants ont été rapportés chez des patientes présentant une IOP, cependant le mécanisme responsable de l'IOP chez ces patientes n'est pas encore complètement déterminé (Di Pasquale et al., 2006; Laissue et al., 2006; Persani et al., 2014; Rossetti et al., 2009).

### **b) Voie de signalisation PI3K**

Nous avons vu précédemment que la voie de signalisation Kitl/Kit est impliquée dans la mise en place du follicule primordial. Cependant, il joue également un rôle tout au long du développement folliculaire. En effet, KIT est exprimé à la surface de l'ovocyte à tous les stades du développement folliculaire et le blocage de cette voie de signalisation est responsable d'anomalies de développement du follicule primordial jusqu'au stade pré-antral suggérant un rôle de KIT/KITL dans le développement du follicule indépendamment des gonadotrophines (Yoshida et al., 1997). L'utilisation de modèle de culture d'ovocyte *in vitro* a permis de montrer le rôle de KITL dans l'activation de la voie de signalisation PI3K (Reddy et al., 2005).

La voie de signalisation de PI3K (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) est une voie de signalisation classique constituée de nombreuses molécules de signalisation dont des kinases, des phosphatases et des facteurs de transcription. Ces molécules jouent un rôle fondamental dans la régulation de la prolifération cellulaire, la survie, la migration et le métabolisme (Cantley, 2002; Stokoe, 2005). L'activation de la voie de PI3K au niveau de l'ovocyte entraîne le recrutement en particulier d'Akt qui est une molécule centrale de la voie PI3K/AKT. Une des cibles de AKT (AKT serine/threonine kinase) est la famille de facteurs de transcription FOXO et en particulier les facteurs FOXO1 (forkhead box O1) et FOXO3A (forkhead box O3A) (Accili and Arden, 2004; Arden and Biggs, 2002). De manière intéressante, FOXO3A est exprimé dans l'ovocyte au stade de follicule primordial et de

follicule primaire. Les souris *KO Foxo3a<sup>-/-</sup>* présentent une activation folliculaire excessive responsable d'une mort ovocytaire et d'une diminution du stock folliculaire. FOXO3A est donc un répresseur de l'activation folliculaire (Castrillon, 2003). Ceci a également été montré par Liu et al. qui ont produit des souris qui exprimaient de manière constitutive FOXO3A et qui étaient également infertile mais dans ce cas suite à un retard de croissance ovocytaire et un retard de développement folliculaire (Liu et al., 2007). Des variations de *FOXO3A* chez des patientes ont été rapportées présentant une IOP mais le rôle pathologique de ces variations restent à déterminer (Wang et al., 2010; Watkins et al., 2006). Le facteur PTEN (phosphatase and tensin homolog) en revanche régule négativement la voie PI3K/AKT. L'inactivation de PTEN dans les ovocytes de souris est responsable de l'activation de l'ensemble du pool de follicules primordiaux conduisant à l'épuisement prématuré du stock folliculaire et à une IOP (Kim et al., 2007; Reddy et al., 2008).

### c) *LHX8*

D'autres facteurs régulent l'activation folliculaire. C'est le cas de LHX8 (LIM homeobox gene 8), un facteur de transcription à homeobox qui est fortement exprimé dans l'ovocyte au stade de follicule primordial mais également tout au long du développement du follicule. L'étude histologique des ovaires des souris *Lhx8<sup>-/-</sup>* montre que ceux-ci ont un aspect normal à la naissance, avec la présence de nombreux follicules primordiaux. En revanche, à 8dpc, la transition de ces follicules vers le stade de follicule primaire ne se fait pas. L'étude de l'expression des gènes nécessaires au développement folliculaire montre une absence d'expression de *Gdf9*, *Pou5f1* et *Nobox* (Choi et al., 2008b). Une étude plus récente chez des souris *KO* pour *Lhx8* au stade de follicule primordial montre cette fois-ci une activation massive du pool de follicules primordiaux avec au niveau moléculaire la translocation de FOXO3A du compartiment nucléaire vers le compartiment cytoplasmique suggérant une inhibition de la voie PI3K/AKT (Ren et al., 2015).

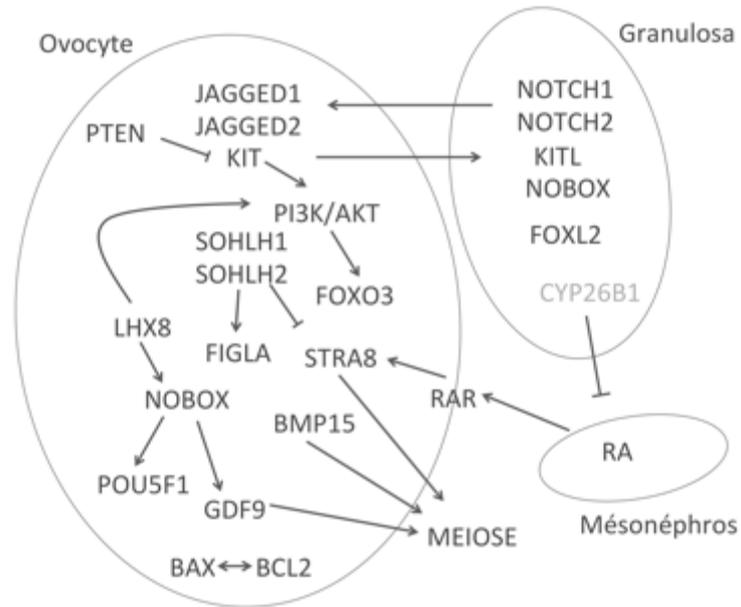


Figure 11. Schéma des principaux facteurs et voies de signalisation impliqués dans le développement folliculaire basal. (RA : acide rétinoïque)

#### 4. Croissance folliculaire hormonodépendante

A partir du stade antral, la croissance du follicule se fait sous la dépendance de la FSH. En effet, celle-ci est nécessaire pour la survie du follicule antral, pour la prolifération des cellules de la granulosa, pour l'expression des récepteurs à la LH (luteinizing hormone) et pour la production d'œstradiol. La FSH se fixe sur son récepteur FSHR situé au niveau des cellules de la granulosa permettant l'activation de la voie de signalisation adénylyl cyclase/cAMP/protéinase K (PKA) responsable de la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription CREB (cAMP-response element-binding protein) entraînant l'activation des gènes cibles et en particulier l'aromatase (CYP19A1 - cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1) et le récepteur à la LH (LHR – luteinizing hormone receptor) (Edson et al., 2009). La fixation de la FSH est également responsable de l'activation de voies de signalisation indépendante de PKA telle que la voie PI3K/AKT. Les souris *KO* pour *Fshβ* qui code pour la sous-unité beta de la protéine FSH présente des follicules aux différents stades de maturation depuis le stade primordial jusqu'au stade pré-antral. En revanche, aucun follicule au stade antral et préovulatoire ne sont présent (Kumar et al., 1997). Plusieurs mutations ont été identifiées chez des patientes ayant une IOP. Ces mutations sont responsables d'anomalies d'adressage ou d'expression de la protéine à la membrane ou bien modifient la transduction du signal (Beau et al., 1998; Rannikko et al., 2002).

### F. Insuffisance Ovarienne Prématurée

#### 1. Définition

L'insuffisance ovarienne prématurée se définit par la survenue d'une aménorrhée primaire ou secondaire avant l'âge de 40 ans avec un taux élevé de gonadotrophines (FSH>40UI/l). La prévalence est estimée entre 1 et 5% de la population féminine (De Vos et al., 2010). Cliniquement, l'IOP peut se manifester sous différentes formes : un impubérisme avec une absence de développement mammaire, une aménorrhée primaire, une aménorrhée primo-secondaire ou une aménorrhée secondaire. Les signes cliniques sont liés à la carence œstrogénique : bouffées de chaleur, insomnie, asthénie, dyspareunie et troubles de l'humeur (Christin-Maitre et al., 2006). Trois mécanismes peuvent expliquer la survenue d'une IOP : 1) une anomalie de la formation du pool de follicules primordiaux ; 2) un blocage de la

maturation folliculaire à n'importe quelle étape du développement folliculaire ; 3) un épuisement anormalement rapide du stock folliculaire.

Les causes d'IOP sont multiples : auto-immunes, iatrogènes (liée à une chirurgie, une chimiothérapie ou une radiothérapie), environnementales ou génétiques. Cependant dans la majorité des cas, la cause n'est pas retrouvée et on parle alors d'IOP idiopathique. Il est à noter que dans 10 à 15% des cas, il existe une histoire familiale d'IOP suggérant une cause génétique dans certains cas. Les causes génétiques d'IOP sont nombreuses, les plus fréquentes sont les anomalies chromosomiques et les mutations ponctuelles dans des gènes responsables d'IOP isolée ou syndromique.

## 2. Anomalies chromosomiques impliquées dans les IOP

Le syndrome de Turner est la cause chromosomique d'IOP la plus fréquente et concerne une fille sur 2500 naissances environ. Il se définit par la présence d'une monosomie X qui peut être complète ou partielle, homogène ou en mosaïque. Cliniquement, on retrouve une petite taille, une dysgénésie gonadique avec des ovaires sous forme de bandelettes fibreuses et un syndrome malformatif. Les patientes présentent le plus souvent une aménorrhée primaire même si des pubertés spontanées et des grossesses ont été rapportées (Sybert and McCauley, 2004).

Les patientes présentant une formule chromosomique 47,XXX ont habituellement une fertilité normale mais quelques cas d'IOP ont été rapportés.

Les délétions du bras longs du chromosome X sont associées à une IOP. L'étude des points de cassure des translocations X;autosomes a permis d'identifier les régions du bras long du chromosome X qui étaient indispensables à une fonction ovarienne. Deux régions sur le bras long ont été identifiées : la région *POF1* (Premature ovarian Failure 1) située en Xq26-q28 et la région *POF2* (Premature ovarian Failure 2) située en Xq13.3-q21.1. Les patientes ayant une délétion terminale du bras long du chromosome X dont le point de cassure passe par la région *POF2* ont un phénotype plus sévère que celles qui ont un point de cassure dans *POF1*. En effet, elles présentent le plus souvent une aménorrhée primaire alors que les autres patientes présentent plutôt une aménorrhée secondaire. Plusieurs gènes situés dans ces deux régions ont été proposés pour expliquer le phénotype d'IOP. Le gène *DIAPH2* (*Diaphanous-related formin 2*) situé en Xq22 code pour un homologue du gène *Dia* chez la drosophile chez

laquelle il est responsable d'infertilité (Bione et al., 1998), cependant, il n' a pas été impliqué dans d'autres études par la suite. Le gène *XPNPEP2* (*X-prolyl aminopeptidase 2*) retrouvé impliqué chez 9 patientes ayant une translocation X;autosome, mais le rôle de cette protéine n'est pas complètement élucidé (Prueitt et al., 2000). Le gène *POF1B* (*premature ovarian failure, 1B*) situé dans la région *POF2* a également été évoqué, le séquençage du gène dans une famille avec une forme familiale d'IOP a permis d'identifier une mutation homozygote dans l'exon 10 chez tous les apparentés atteints. Cette protéine pourrait jouer un rôle dans la division des cellules germinales (Lacombe et al., 2006). Enfin, le gène *PGRMC1* (*progesterone receptor membrane component 1*) situé en Xq24 a été identifié chez une mère et sa fille. *PGRMC1* jouerai un rôle antiapoptotique des cellules ovariennes par la voie de signalisation de la progestérone (Mansouri et al., 2008). D'autres études ont identifié des variations faux-sens dans *PGRMC1* (Mansouri et al., 2008; Wang et al., 2014b).

Un aperçu des causes chromosomiques d'IOP est présenté dans le Tableau 6.

Tableau 6. Principales causes chromosomiques d'IOP.

Type d'anomalie	Anomalie	Locus	Phénotype	Fréquence
Anomalies de nombre	Syndrome de Turner	Xp11.2-p22.1	Petite taille, syndrome malformatif, CGD (ou PGD)	1/2.500
	Triple X	47,XXX	Quelques cas d'IOP	1/900
Anomalies de structures	Délétion terminale Xq (POI2)	Xq13-q21	Aménorrhée primaire, impubérisme	Rare
	Délétion terminale Xq (POI1)	Xq23-q28	Aménorrhée secondaire	Rare
	TranslocationX;autosome	NA	Aménorrhée primairsecondaire	Rare

### 3. IOP syndromiques

Dans certains cas, l'IOP fait partie d'un phénotype plus complexe impliquant des anomalies d'autres organes ou tissus. On parle alors d'IOP syndromique. Plusieurs gènes ont été identifiés comme étant responsables d'IOP syndromique, ils sont rapportés dans le Tableau 7.

#### Syndrome BPES

Le syndrome BPES (Blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome) (OMIM #110100) correspond à un trouble ophtalmologique associant un blépharophimosis, un ptosis, un épitcanthus et un télécanthus. Dans certains cas peut s'y associer une IOP, on parle alors de BPES de type I, ou bien être isolé dans les BPES de type II (Zlotogora et al., 1983). Le gène *FOXL2* dont nous avons vu le rôle dans le développement ovarien et folliculaire a été identifié comme responsable de syndrome BPES de type I et de type II (Crisponi et al., 2001). Les mutations conduisant à la production d'une protéine tronquée sont plutôt responsables de syndrome BPES de type I tandis que les mutations conduisant à une augmentation du domaine poly-Alanine sont plutôt responsable des BPES de type II (Pisarska et al., 2011) (Figure 12). Des mutations de *FOXL2* ont également été retrouvées chez des patientes ayant une IOP isolée. Il est estimé que 2 à 3% des patientes ayant une IOP auraient une mutations dans le gène *FOXL2* (Harris et al., 2002; Qin et al., 2015).

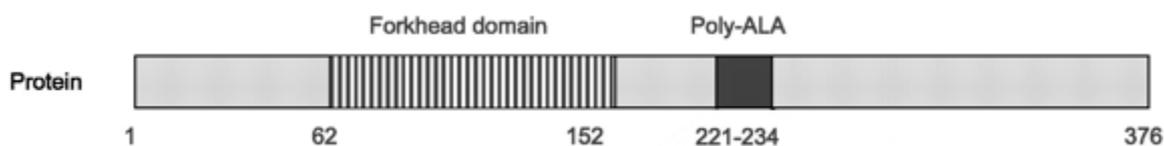


Figure 12. Structure de la protéine FOXL2 qui contient un domaine Forkhead dans sa partie N terminale et un stretch poly-alanine.

## **Galactosémie**

La galactosémie (OMIM #230400) est une maladie métabolique liée à une anomalie du métabolisme du galactose dont l'incidence est estimée à 1/30.000 à 1/60.000. Le phénotype retrouvé est assez sévère avec la présence d'une déficience intellectuelle, une cataracte précoce, un retard staturo-pondéral, une insuffisance rénale et hépatique et chez la femme, une IOP. Le gène impliqué dans cette forme de galactosémie de transmission autosomique récessive est le gène *GALT* (*galactose-1-phosphate uridylyltransferase*) (Calderon et al., 2007). L'IOP survient chez pratiquement toutes les patientes ayant une mutation homozygote dans le gène *GALT* responsable d'une abolition complète ou quasi-complète de l'activité de l'enzyme. L'IOP retrouvée chez ces patientes serait due à une accumulation de galactose au niveau ovarien responsable de l'apoptose des ovocytes (Liu, 2000).

## **Syndrome de Perrault**

Le syndrome de Perrault (OMIM #233400) est caractérisé par l'association d'une dysgénésie ovarienne et d'une surdité neurosensorielle. Chez l'homme, seule la surdité est présente, il n'existe pas de d'anomalie du développement gonadique. La prévalence de ce syndrome n'est pas connue mais probablement sous-estimée en l'absence d'une femme atteinte dans la famille. Le diagnostic est porté devant la présence d'un retard pubertaire (des cas d'aménorrhée secondaire ont été rapportés également) chez une patiente présentant une surdité neurosensorielle de sévérité variable. Dans certains cas peuvent s'associer également des troubles neurologiques tels qu'une déficience intellectuelle, des anomalies cérébelleuses ou des anomalies du système nerveux périphérique (Pierce et al., 2010). Il existe une hétérogénéité génétique puisque cinq gènes ont déjà été impliqués dans ce syndrome.

Tableau 7. Principaux syndromes ou maladies avec les gènes impliqués dans les IOP syndromiques.

Syndrome ou maladie	Gène(s)	Locus	Transmission
BPES	<i>FOXL2</i>	3q22.3	AD
Syndrome de Perrault	<i>HSD17B4</i>	5q23.1	AR
	<i>HARS2</i>	5q31.3	AR
	<i>CLPP</i>	19p13.3	AR
	<i>LARS2</i>	3p21.31	AR
	<i>C10orf2</i>	10q24.31	AR
Galactosémie	<i>GALT</i>	9p13	AR
Pseudohypoparathyroïdie de type 1a	<i>GNAS1</i>	20q13	AD maternel

AR : autosomique récessif; AD : autosomique dominant

#### 4. Gènes impliqués dans les IOP non syndromiques

Les gènes dont nous avons vu l'implication dans le développement folliculaire peuvent être impliqués dans la survenue d'une IOP et ne sont pas représentés ici. Les gènes les plus fréquemment impliqués chez des patientes ayant une IOP sont rapportés dans le Tableau 8.

##### ***FMR1***

Le gène *FMR1* (*fragile X mental retardation*) est situé sur le bras long du chromosome X en Xq27.3. Ce gène est associé au syndrome de l'X-fragile, une maladie héréditaire dominante liée à l'X, qui associe une déficience intellectuelle plus ou moins sévère, des signes physiques discrets tels qu'une dysmorphie et une hyperlaxité des doigts auxquels peuvent s'ajouter également des troubles du comportement. Le syndrome de l'X-fragile est lié à l'inhibition de la transcription du gène *FMR1*, causée par une expansion anormalement élevée de la répétition de triplets (CGG)<sub>n</sub> présent dans la région 5' non traduite du gène et des méthylations qui s'en suivent. Habituellement, le nombre de répétition du triplet CGG est inférieur à 45. Chez les patients ayant un syndrome de l'X-fragile, le nombre de répétition est > 200, on parle alors de mutation complète. Cette dernière apparaît lorsqu'un chromosome X porteur d'un nombre de triplets compris entre 50 et 200 est transmis par une femme : on parle alors de femmes prémutées et celles-ci présentent un risque élevé d'IOP. Chez les hommes

prématurés, le risque serait plutôt l'apparition d'une maladie neurodégénérative ou syndrome FXTAS (Fragile X Tremor and Ataxia Syndrome). En effet, des études ont montré qu'environ 6% des femmes ayant une IOP sont porteuses d'une pré-mutation dans le gène *FMR1* et que 20% des femmes ayant une pré-mutation développent une IOP (Allingham-Hawkins et al., 1999; Hagerman and Hagerman, 2002; Marozzi et al., 2000). Tassone et al. ont montré que la pré-mutation est responsable d'une augmentation de la transcription de *FMR1* (Tassone et al., 2007). Cette augmentation de la concentration de l'ARNm dans la cellule entraîne la formation d'inclusions cytoplasmiques d'ARNm qui auraient pour conséquence, une toxicité cellulaire conduisant à l'apoptose de la cellule (Tassone et al., 2007).

### ***NR5A1***

Le gène *NR5A1* est un acteur majeur du développement gonadique puisqu'il est impliqué dans le développement de la gonade bi-potentielle puis du testicule. Il a également été impliqué dans des cas d'IOP (Janse et al., 2012; Lourenço et al., 2009; Voican et al., 2013). Les mutations de *NR5A1* sont retrouvées dans environ 1% des cas d'IOP. Les conséquences fonctionnelles de ces mutations n'ont pas toujours été confirmées.

D'autres gènes ont été également impliqués dans quelques cas familiaux ou isolés (Qin et al., 2015).

Tableau 8. Gènes les plus fréquemment impliqués dans les IOP non syndromiques.

Gène	Locus	Transmission	Phénotype	Expression / Rôle
<i>FMR1</i>	Xq27.3	Liée à l'X	Aménorrhée secondaire	Expression ovocytaire et dans les cellules de la granulosa (Ferder et al., 2013; Hoffman et al., 2012)
<i>BMP15</i>	Xp11.2	Liée à l'X	Aménorrhée primaire ou secondaire	Expression ovocytaire dans le follicule primaire (Dube et al., 1998; Laitinen et al., 1998)
<i>PGRMC1</i>	Xq24	Liée à l'X	Aménorrhée secondaire	Régulation de la prolifération des cellules de la granulosa (Peluso, 2013)
<i>POF1B</i>	Xq21.2	Récessive liée à l'X ?	Aménorrhée secondaire	Régulation de la division cellulaire (Lacombe et al., 2006)
<i>FIGLA</i>	2p13.3	AD	Aménorrhée secondaire	Expression ovocytaire dans le follicule primordial (Soyal et al., 2000)
<i>FSHR</i>	2p16.3	AR	Aménorrhée secondaire	Régulation de la croissance folliculaire et de la maturation ovocytaire (Ulloa-Aguirre et al., 2007)
<i>FOXL2</i>	3q23	AD	BPES type 1 ou 2	Expression dans les cellules de la granulosa, formation du follicule primordial (Duffin et al., 2009; Uda, 2004)
<i>GDF9</i>	5q31.1	AD	Aménorrhée secondaire SOPK	Expression ovocytaire tout au long de la maturation folliculaire (McGrath et al., 1995)
<i>NOBOX</i>	7q35	AD	Aménorrhée secondaire	Expression ovocytaire, nécessaire à la maturation ovocytaire (Rajkovic et al., 2004)
<i>NR5A1</i>	9q33.3	AD	Aménorrhée secondaire	Expression dans les cellules de la granulosa tout au long de la maturation folliculaire (Falender et al., 2003)

## **II. Objectifs de l'étude**

L'objectif de ce travail était d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans le développement testiculaire et le développement folliculaire ovarien.

Les objectifs spécifiques de ce travail étaient :

- Identifier de nouveaux gènes impliqués dans le développement testiculaire soit par la recherche de microremaniements chromosomiques soit par une étude d'exome chez des patients DSD 46,XX avec un développement testiculaire ou ovotesticulaire.
  - Etudier la région RevSex dans une cohorte de patients pour évaluer la fréquence des remaniements de cette région dans les cas de DSD 46,XX et DSD 46,XY et pour redéfinir la région minimale critique.
- Identifier de nouveaux gènes impliqués dans le développement folliculaire ovarien par la recherche de microremaniements chromosomiques chez des patientes présentant une IOP



### III. Matériels et méthodes

#### A. Patients

##### 1. Cohortes de patients DSD

###### a) Cohorte DSD 46,XX testiculaire ou ovotesticulaire

Les patients inclus dans cette étude ont été recrutés au sein de l'unité de Génétique Chromosomique du Département de Génétique Médicale de l'hôpital Armand Trousseau à Paris. Ils ont été adressés au laboratoire par les services d'Endocrinologie pédiatrique de l'hôpital Robert Debré ou bien des services d'Endocrinologie adulte et Médecine de la reproduction des hôpitaux de Tenon et de la Pitié-Salpêtrière à Paris ainsi que des services de génétique d'Angers, Montpellier et Poitiers. Les critères d'inclusion dans cette cohorte était la présence d'une caryotype 46,XX sans anomalie décelée en cytogénétique conventionnelle avec une absence du locus *SRY* en *FISH* ou par *PCR*.

###### b) Cohorte DSD 46,XY avec CGD et DSD 46,XX testiculaire ou ovotesticulaire

Les échantillons inclus dans cette cohorte sont issus de la banque d'échantillons du Département de Génétique Humaine de l'Institut Pasteur. La cohorte est composée de patients ayant soit un DSD 46,XY avec une dysgénésie gonadique complète (CGD) ou partielle (PGD), soit de patients 46,XX avec un développement testiculaire.

##### 2. Cohorte de patientes ayant une IOP

Les cas sporadiques d'IOP ont été recrutés au sein des Services d'Endocrinologie des hôpitaux Saint Antoine et Pitié-Salpêtrière à Paris. Les cas familiaux d'IOP ont été recrutés au cours du PHRC FAMIOP "Analyse génétique des formes familiales d'Insuffisances Ovariennes Prématuurées". Les critères d'inclusion dans cette étude étaient : 1) un caryotype sans anomalie décelée; 2) une absence de pré-mutation du gène *FMRI*. Toutes les patientes ont eu une évaluation clinique et un dosage des gonadotrophines selon les recommandations afin de confirmer l'IOP.

Tous les patients (ou les parents pour les patients mineurs) inclus dans ce travail ont signé un consentement pour la réalisation d'études génétiques afin d'identifier l'anomalie génétique responsable de la pathologie.

## **B. Etude génétique pangénomique**

Dans les années 1990, les puces à ADN génomique ou micro-array ont été mises au point pour permettre un criblage global du génome avec une meilleure résolution que celle du caryotype. Ces puces permettent de mettre en évidence des déséquilibres génomiques en perte ou en gain de tout ou partie d'une ou plusieurs régions génomiques. Ces techniques sont basées soit sur le principe de l'hybridation génomique comparative entre deux ADNs (Comparative Genomic Hybridization array - CGH array) soit sur une approche d'analyse des SNPs (Single Nucleotide Polymorphism array - SNP array). Elles peuvent détecter des pertes ou des gains du nombre de copies (Copy Number Variations - CNV) et ainsi identifier des anomalies chromosomiques déséquilibrées. En revanche, elles ne peuvent pas identifier les remaniements équilibrés de type inversion, translocation et insertions. Ces deux types de puces ont été utilisés pour ce travail.

### **1. CGH array**

La CGH array repose sur le principe de la CGH, mais cette technique est réalisée sur une lame de verre sur laquelle sont déposées des séquences d'ADN connues. Après avoir cohybridé l'ADN du patient et l'ADN du témoin pendant au moins 16 heures, la lecture des signaux est réalisée grâce à un scanner laser automatisé. Une analyse informatique des données est ensuite réalisée à l'aide d'un logiciel qui enregistre l'intensité de fluorescence de l'ADN marqué avec chacun des fluorochromes. On obtient alors un profil de CGH où chaque point représente le ratio des signaux émis par le fluorochrome 1 et le fluorochrome 2. Afin d'assurer un contrôle interne, l'ADN de chaque patient est à nouveau hybridé avec l'ADN d'un autre témoin en inversant les fluorochromes. Cette technique permet une étude en « dye-swap ». En effet, dans la première technique, le patient est marqué avec le fluorochrome 1 et dans la deuxième technique, avec le fluorochrome 2. Ceci permet de s'assurer que l'anomalie identifiée est bien présente chez le patient lorsqu'on hybride contre deux témoins différents. Une stratégie d'hybridation des patients en trio permet que chaque patient serve de témoin à deux autres patients. Cependant, l'utilisation de cette stratégie impose de ne pas mettre dans

un même trio deux patients avec un même phénotype dans le cas où les deux patients auraient la même anomalie.

La puce utilisée est une puce Human Genome CGH Microarray Kit 180K Agilent de haute résolution, constituée de 170 000 sondes oligonucléotidiques de 60-mer réparties dans les régions codantes et non codantes du génome. L'intervalle médian théorique entre deux sondes est de 13 kb permettant d'avoir une résolution minimum d'environ 50 kb. La puce a été scannée à l'aide du scanner Agilent G2656BA. Les données ont été extraites à l'aide du logiciel Feature Extraction de la société Agilent et l'analyse a été faite avec le logiciel Nexus Copy Number v5.1 de la société Biodiscovery. Les critères pour retenir un CNV étaient au moins trois sondes consécutives pour lesquelles le  $\log_2$ ratio était  $> 0.50$  pour un gain ou  $< -0.75$  pour une perte.

## **2. SNP array**

Le deuxième type de puce utilisé était une puce SNP. Ce type de puce permet de détecter non seulement des CNV comme la CGH array mais également d'étudier le génotype du patient. Ainsi pour chaque SNP il est possible d'établir le génotype du patient et savoir s'il est hétérozygote ou homozygote. Cette technique permet donc de mettre en évidence des pertes d'hétérozygotie ou LOH (Loss of Heterozygosity) ou ROH (Region of Homozygosity). Les ROH correspondent à des régions où tous les marqueurs de l'individu sont homozygotes. Deux mécanismes permettent d'expliquer la présence de ROH. Dans le premier cas, le patient est homozygote pour tous les marqueurs car il a reçu des copies identiques de chacun des parents car ceux-ci sont apparentés et ont donc reçu cette copie d'un ancêtre commun plus ou moins éloigné. Dans le deuxième cas, il existe une disomie uniparentale (Uniparental Disomy - UPD) c'est-à-dire que le sujet a reçu les deux chromosomes d'une même paire d'un seul des deux parents.

Nous avons utilisé deux types de puces SNP de la société Illumina. D'une part, une puce HumanCytoSNP-12 BeadChip (Infinium HD) et d'autre part, une puce Human OmniExpress BeadChip (Infinium HTS). La puce OmniExpress est constituée de 715 000 marqueurs SNPs répartis dans les régions codantes et non codantes du génome avec un marqueur situé tous les 5 kb en moyenne donnant une résolution minimale de 15 kb. Les données ont été analysées avec le logiciel Genome Studio Genotyping Module de la société

Illumina. Les critères pour retenir un CNV étaient identiques à ceux retenus pour la puce CGH array : au moins trois sondes consécutives pour lesquelles le  $\log_2$ ratio était  $> 0.50$  pour un gain ou  $< -0.75$  pour une perte avec en plus une perte de la BAF (B allele frequency) égale à 0.5 pour les délétions et l'apparition de deux BAF à 0.33 et 0.66 pour les duplications. La taille minimale pour l'étude des ROH était de 2 Mb.

### **3. Interprétation des données**

Les données de puces ont été interprétées à l'aide de différents outils disponibles. La base de données Database of Genomic Variants (DGV) qui répertorie les CNV présents chez des sujets sains et donc considérés comme polymorphiques (Copy Number Polymorphisms - CNP) a servi de contrôle pour éliminer les CNV non pathogènes. La base de données DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources) a également été utilisée pour identifier des CNVs déjà rapportés chez des sujets présentant un phénotype particulier.

L'ensemble des gènes présents dans les régions de ROHs a été défini à l'aide de l'outil Genomic Oligoarray and SNP array evaluation tool v3.0 ([http://firefly.ccs.miami.edu/cgi-bin/ROH/ROH\\_analysis\\_tool.cgi](http://firefly.ccs.miami.edu/cgi-bin/ROH/ROH_analysis_tool.cgi)). Le résumé de la fonction de chaque gène a été répertorié à l'aide de l'outil GeneAlaCart (<https://genealacart.genecards.org/Query>) utilisant Entrez Gene Summary et UniProtKB Summary. La recherche de gènes d'intérêt a ensuite été faite par l'utilisation de mots clés : "Testis", "Ovary", "Ovarian", "Genital", "Ridge", "Wnt", "MAP", "Cell cycle", "Catenin".

## C. Etude génétique ciblée

### 1. Séquençage Sanger

Le gène *CPEB1* (*cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1*) a été séquençé par les techniques de séquençage Sanger classique. Les séquences codantes ainsi que les régions introniques flanquantes des 12 exons du gène ont été étudiées (NM\_030594.4). Les amorces de PCR et de séquence pour chaque exon ont été choisies à l'aide du logiciel Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) et sont présentées dans le Tableau 9 et le Tableau 10.

Le mix de PCR pour chaque amplicon a été réalisé de la manière suivante : 10 µl de GoTaqG2 Green Master Mix 2X Promega, 0.9 µl d'amorce sens et 0.9 µl d'amorce antisens à 5 pmol/µl, 2 µl d'ADN à séquençer à 50 ng/µl, pour l'exon 1 uniquement 1 µl de DMSO 5% et de l'H<sub>2</sub>O q.s.p 20 µl. Les conditions d'amplification de la PCR étaient de 94°C pendant 5 minutes puis 35 cycles avec une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation des amorces à 58°C pendant 30 secondes et une polymérisation du fragment à 72°C pendant 45 secondes puis une élongation finale à 72°C pendant 5 minutes et la conservation du produit de PCR à 10°C. Afin de vérifier que les amplicons étaient à la taille attendue, 5µl de produit de PCR a été déposé sur un gel d'agarose à 1% contenant du SYBR safe avec un marqueur de taille 1 kb+. Les produits de PCR ont ensuite été purifiés par ExoSAP-IT selon les recommandations du fabricant.

La réaction de séquence a ensuite été réalisée dans les conditions suivantes : 1.5µL de tampon BigDye 5X, 1 µL de BigDye® Terminator v3.1, 4.5 µL d'H<sub>2</sub>O, 2 µL d'amorce de séquence et 1 µL de produit de PCR purifié. Les conditions d'amplification étaient les suivantes : 96°C pendant 1 minute puis 25 cycles avec une dénaturation à 96°C pendant 10 secondes, puis l'hybridation de l'amorce à 55°C pendant 5 secondes puis l'élongation à 60°C pendant 2 minutes en ajoutant 2 secondes à chaque cycle, puis conservation à 10°C. Les produits de la réaction de séquence ont ensuite été purifiés sur une colonne de Sephadex G50 superfine. Enfin, les fragments ont été séparés sur un séquenceur d'ADN par électrophorèse capillaire ABI 3730XL (Applied Biosystems). Les électrophorégrammes ont été analysés et comparés à la séquence de référence à l'aide du logiciel SeqScape v2.5.

Tableau 9 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR des exons 1 à 12 du gène *CPEB1*.

Exon	Nom des amorces*	Séquence 5'-3'	Orientation	Taille amplicon (pb)
Exon 1	CPEB1-ex1F	GAG-GAG-CGG-CTC-GTA-GGA	Sens	496
	CPEB1-ex1R	TGC-TCC-TTT-ATG-TCC-GGT-CA	Antisens	
Exon 2	CPEB1-ex2F	TTT-TTC-TTA-CAG-TTC-CGA-GTA-CTT-AGC	Sens	489
	CPEB1-ex2R	AAA-CTA-AAC-CAC-AAA-AAG-GCA-AG	Antisens	
Exon 3	CPEB1-ex3F	CGT-CCC-CAA-AAG-TGC-AGA-G	Sens	497
	CPEB1-ex3R	TTC-CAT-CTC-TTG-CAA-AAC-AGC	Antisens	
Exon 4	CPEB1-ex4F	ATT-GTG-TTT-TGC-TGG-CAT-GC	Sens	484
	CPEB1-ex4R2	CTC-ATC-CCA-TCT-CCC-AGC-C	Antisens	
Exon 5	CPEB1-ex5F	AGT-GAG-ATG-TAC-CTT-GTT-CCC-T	Sens	599
	CPEB1-ex5R	GCA-GAT-CTG-GAG-ACT-TCA-CC	Antisens	
Exon 6-7	CPEB1-ex6-7F	TGA-CTG-AGT-GGA-TTG-GTG-AGA-C	Sens	826
	CPEB1-ex6-7R	GTG-CCC-ACC-ATG-TTA-CCA-AC	Antisens	
Exon 8	CPEB1-ex8F	GCA-AAT-GCT-TCC-ACT-CAA-CA	Sens	599
	CPEB1-ex8R	TTT-GAA-ACC-AAA-GTG-TTG-GCT-A	Antisens	
Exon 9	CPEB1-ex9F	AGC-ACC-TTT-TCA-CCC-CTG-TA	Sens	500
	CPEB1-ex9R	TAC-AGA-AGG-GCC-AGT-ACT-CG	Antisens	
Exon 10	CPEB1-ex10seqF	CAG-GAG-AAT-GGC-GTG-AAA-CC	Sens	429
	CPEB1-ex10R	CCACTCCCAAACCCTAACCT	Antisens	
Exon 11	CPEB1-ex11F	TAT-CCC-GCA-TTC-CTG-TGT-GT	Sens	464
	CPEB1-ex11R	CCT-GAT-CCG-CCC-ACC-TTG	Antisens	
Exon 12	CPEB1-ex12F	AGT-CTC-CCA-CCC-TTC-TCC-A	Sens	372
	CPEB1-ex12R	GCA-GAA-ACA-AAG-ACA-GAT-TCA-GC	Antisens	

Tableau 10 : Amorces utilisées pour la réaction de séquence du gène *CPEB1*.

Exon	Nom des amorces*	Séquence 5'-3'	Orientation
Exon 1	CPEB1-ex1seqF	ctt-cat-aag-ctg-ccg-ggg-t	Sens
	CPEB1-ex1seqR	ctg-agt-cac-gag-gag-gct-c	Antisens
Exon 2	CPEB1-ex2seqF	att-cgt-aat-gtg-gag-aga-aag-g	Sens
	CPEB1-ex2seqR	agc-ttt-cca-agg-aag-acc-tc	Antisens
Exon 3	CPEB1-ex3seqF	ctg-tga-gcc-tgg-gga-aac-ta	Sens
	CPEB1-ex3seqR	gga-gtg-atg-caa-agg-gga-ac	Antisens
Exon 4	CPEB1-ex4seqF	ttg-ggt-ggc-tgt-agg-aga-ag	Sens
	CPEB1-ex4seqR	ttg-tac-cct-cct-tcc-cct-tg	Antisens
Exon 5	CPEB1-ex5seqF	tga-atg-agg-aga-gaa-gga-gca	Sens
	CPEB1-ex5seqR	gca-acc-aag-cct-cct-cta-ga	Antisens
Exon 6-7	CPEB1-ex6-7seqF	att-gtg-gcc-agt-cag-gtt-ct	Sens
	CPEB1-ex6-7seqR	gac-atc-cca-gca-ccc-cta	Antisens
Exon 8	CPEB1-ex8seqF	cct-gct-gca-aag-cca-agg	Sens
	CPEB1-ex8seqR	cct-gcc-tat-cca-cct-acc-ac	Antisens
Exon 9	CPEB1-ex9seqF	tct-cca-gag-cac-gta-cct-tg	Sens
	CPEB1-ex9seqR	ctc-tct-cct-cac-tcc-cat-gg	Antisens
Exon 10	CPEB1-ex10R	CCACTCCCAAACCTAACCT	Sens
	CPEB1-ex10seqR	ttc-cct-aaa-cac-acc-cag-ca	Antisens
Exon 11	CPEB1-ex11seqF	gtg-ccc-ttc-ttc-tat-cgc-ct	Sens
	CPEB1-ex11seqR	tgg-gat-tac-agg-tgt-gaa-cca	Antisens
Exon 12	CPEB1-ex12seqF	aac-aga-aca-agc-agc-tcg-tg	Sens
	CPEB1-ex12seqR	tcc-ttg-gga-agc-cag-ctc	Antisens

## 2. Long-range PCR

Une technique de long-range PCR a été utilisée pour déterminer les points de cassure exact de la duplication en amont de *SOX9* retrouvée chez deux patients. Différents types de duplication sont possibles. Le type le plus fréquent correspond à la duplication directe en tandem, mais on peut également avoir des duplications inversées, des duplications inversées insérées ou enfin une insertion du fragment dupliqué ailleurs dans le génome (Figure 13).

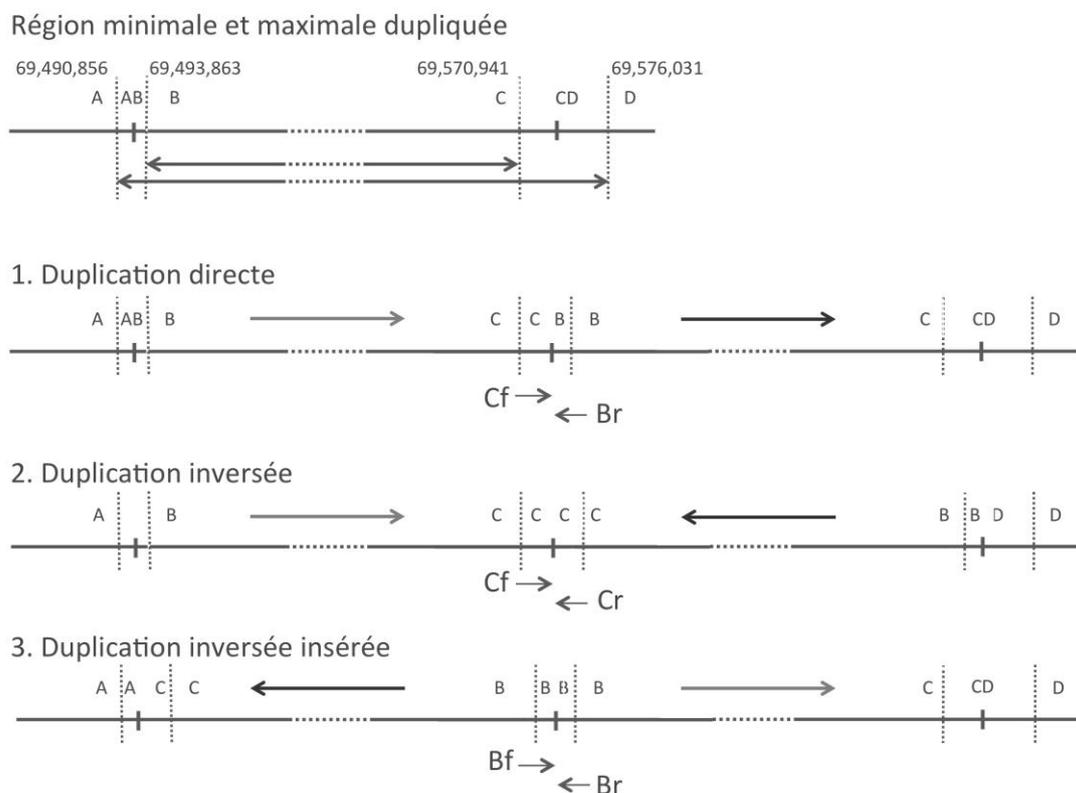


Figure 13. Schéma représentant les différents mécanismes de duplication.

Le schéma du haut représente la région minimale et la région maximale dupliquée chez les patients T1 et T2 selon les résultats de l'étude en puce SNP.

Sur les schémas 1, 2 et 3, la flèche noire représente le segment dupliqué avec son orientation lors de la duplication.

Bf : amorce *forward* dans la région B ; Br : amorce *reverse* dans la région B ; Cf : amorce *forward* dans la région C ; Cr : amorce *reverse* dans la région C.

Nous avons choisi des amorces en supposant qu'il s'agissait d'une duplication directe en tandem. Deux amorces sens et deux amorces antisens ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer3 et différentes conditions d'amplifications ont été testées, elles sont rapportées dans le Tableau 11. Le mix de PCR était le suivant : 5 µl de tampon Expand Long Template BufferExpand (1 ou 2 ou 3) 10X Roche, 8.75 µl de dNTP 2mM, 3 µl d'amorce sens à 5 pM, 3 µl d'amorce antisens à 5 pM, 0.75 µl de d'enzyme Long Template Enzyme Mix Roche, 3 µl d'ADN à 50 ng/µl et 26.5 µl d'H<sub>2</sub>O pour un volume final de 50 µl. Les conditions d'amplification utilisées étaient les suivantes : 2 minutes à 94°C suivies de 10 cycles comprenant la dénaturation à 94°C pendant 10 secondes, l'hybridation de l'amorce à 60°C pendant 30 secondes, l'élongation à 68°C pendant 10 minutes puis ensuite 30 cycles dans les mêmes conditions mais en ajoutant 20 secondes d'élongation supplémentaire à chaque cycle.

Tableau 11. Couples d'amorces et tampons testés pour la long-range PCR.

Tampon 1	Tampon 2	Tampon 3
Cf1Br1	Cf1Br1	Cf1Br1
Cf1Br2	Cf1Br2	Cf1Br2
Cf2Br1	Cf2Br1	Cf2Br1
Cf2Br2	Cf2Br2	Cf2Br2

Bf : amorce *forward* dans la région B ; Br : amorce *reverse* dans la région B ; Cf : amorce *forward* dans la région C ; Cr : amorce *reverse* dans la région C.

Le fragment obtenu a ensuite été séquencé par différentes amorces de séquence afin d'identifier le point de cassure. Les amorces ont été choisies à l'aide du logiciel Primer3 et sont rapportées dans le Tableau 12. Le mix réalisé et les conditions d'amplifications étaient identiques à celles utilisées pour la réaction de séquence de *CPEB1*.

Tableau 12. Séquence des amorces utilisées pour séquencer le fragment contenant le point de cassure.

Nom des amorces*	Séquence 5'-3'	Orientation
CDf1	CCTCTAGCCAACACATTTTAGCA	Sens
CDf2	CTAGGAAATTCTGACTGCAAGCA	Sens
CDf4	CAGTTGCGAGAATCTGAGCAG	Sens
CDf5	GCAGTTGATAGTACTCTGGTCCT	Sens
CDf6	TGCTATCCCCAAGTCAAGATACA	Sens
CDf7	CTCATTGTTTGGAAAGTTGCTGG	Sens
ABr1	TTGTACAGTCTTCTTGTGATGA	Antisens
ABr2	TCGTAAATGGGATTGGCTTCTC	Antisens
ABr3	AAATCTGCTTTGGGACTTTGGTT	Antisens
ABr4	ATCAGGACAGAACCCCATCG	Antisens
ABr5	GGCCGCAAGTAGATATGTAGTTC	Antisens

CDf : amorce *forward* dans la région CDD ; ABr : amorce *reverse* dans la région AB.

### 3. QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of short fluorescent fragments)

La technique de QMPSF permettant de rechercher des gains ou des pertes de copies par PCR multiplex a été décrite par Yau *et al* en 1996 (Yau et al., 1996). Le principe repose sur la réalisation d'une PCR multiplex en phase exponentielle.

Une PCR multiplex contenant 5 amplicons a été élaborée : trois amplicons dans les exons 3, 4 et 12 du gène *CPEB1* (NM\_030594.4), un amplicon dans le gène *GFAP* (glial fibrillary acidic protein) comme contrôle pour normaliser les résultats et un amplicon dans le gène *DMD* situé sur le chromosome X comme contrôle interne. Les amorces ont été choisies à l'aide du logiciel Primer Premier et sont rapportées dans le Tableau 13. Toutes les amorces sens ont été marquées en 5' par une fluorochrome le 6-Fluorescein phosphoramidite (6-FAM) (MWG Biotech). Les amplifications ont été réalisées dans un volume final de 20 µl contenant 2 µl d'ADN à 50 ng/µl, 2 µl de mix d'amorces à 2 pmol/µl, 10 µL de 2X Qiagen master mix, 2µL de solution Q et de l'H<sub>2</sub>O q.s.p 20 µl. Les conditions d'amplification utilisées pour la PCR mutliplex étaient les suivantes : dénaturation initiale à 95°C pendant 15 minutes suivie

de 22 cycles comprenant la dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, l'hybridation à 58°C pendant 90 secondes puis la polymérisation à 72°C pendant 60 secondes, une étape finale d'extension à 72°C pendant 20 min et une conservation à 10°C. Un microlitre du produit de PCR a ensuite été resuspendu dans un mix contenant 18.5 µl de formamide et 0.5 µl de marqueur de taille GeneScan-500 Rox puis chauffé à 95°C pendant 3 afin de dénaturer les fragments puis séparés sur le séquenceur ABI 3730 XL.

L'analyse des signaux a été réalisée à l'aide du logiciel Gene Mapper qui permet de représenter l'intensité de fluorescence de chaque fragment sous la forme d'un pic. La hauteur du pic ou l'aire sous le pic représente la quantité de produit de PCR. Chaque expérience a été réalisée avec 3 témoins : un témoin masculin, un témoin féminin et un contrôle positif ayant une délétion hétérozygote du gène *CPEB1*. Afin de déterminer le nombre de copie du gène, un *dosage quotient* (DQ) a été calculé pour chaque fragment déterminé par la formule suivante :

$$DQ = \frac{\left( \frac{\text{Aire (hauteur) du pic gène cible}}{\text{Aire (hauteur) du pic gène GFAP}} \right)_{\text{patient}}}{\left( \frac{\text{Aire (hauteur) du pic gène cible}}{\text{Aire (hauteur) du pic gène GFAP}} \right)_{\text{contrôle}}}$$

Cette équation permet d'avoir une valeur théorique de *DQ* égale à 1 dans le cas où il y a deux copies du gène, il sera égal à 0.5 dans le cas d'une délétion et égal à 1.5 dans le cas du gain d'une copie. Les seuils retenus pour l'interprétation sont une valeur de *DQ* < 0.55 pour une délétion et une valeur de *DQ* > 1.2 pour une duplication.

Tableau 13 : Amorces utilisées pour la PCR multiplex pour la QMPSF du gène *CPEB1*.

Cible	Nom des amorces*	Séquence 5'-3'	Orientation
Exon 3	CPEB1-E2F*	CTTGGATGTCTGGCCTGTGA	Sens
	CPEB1-E2R	CTGCTCTGGGCTGAGGAATC	Antisens
Exon 4	CPEB1-E3F*	TGTGTTTTGCTGGCATGCTT	Sens
	CPEB1-E3R	GAAGCCACTGGTGTCTGAGT	Antisens
Exon 12	CPEB1-E11F*	CTGTGTTGGGGTGAAGCAT	Sens
	CPEB1-E11R	TTCCCTGTCTGGGAAGC	Antisens
GFAP	GFAP-F*	GGGAGACTGAGGCAGGTATTC	Sens
	GFAP-R	GAGCAGCACATTGCTCTGG	Antisens
DMD	DMD-F*	CCCTAAAGAGAATAAGCCCAGGTA	Sens
	DMD-R	TCCTATCCTCACAAATATTACCATGAA	Antisens

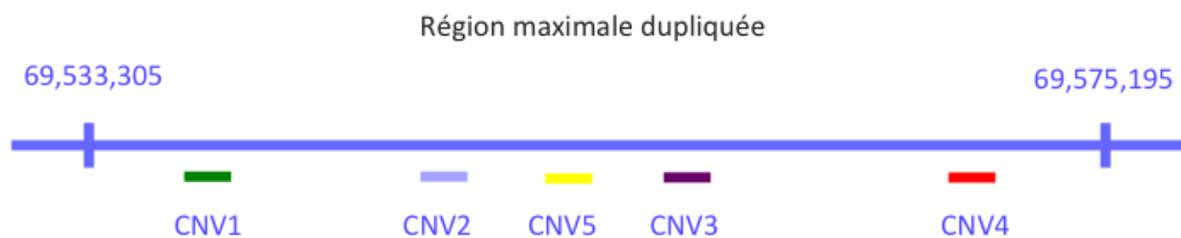
F : forward ; R : reverse ; E2, E3, E11 : numéro de l'exon ; \* : extrémité 5' marquée.

#### 4. PCR quantitative

La région *RevSex* située en amont du gène *SOX9* a été analysée par une technique de PCR quantitative pour rechercher des duplications et des délétions de cette région. Quatre PCR duplex ont été élaborées dans un premier temps, contenant à la fois la région cible (CNVX-SOX9) et une région contrôle (RNase P). Une cinquième PCR duplex (CNV5-SOX9) a été élaborée ensuite. Les amorces et la sonde utilisés pour chaque test de la région cible ont été choisis à l'aide du logiciel Primer3 et sont rapportés dans le Tableau 14. La sonde pour chaque région cible était marqué avec un fluorochrome 5-FAM (5-Carboxyfluorescein) tandis que la sonde de la région de référence (RNase P) était marqué avec le fluorochrome VIC. Chaque échantillon a été testé en triplicat dans chaque technique. Et chaque CNV a été testé deux fois pour chaque patient. Le mix de PCR a été réalisé de la manière suivante pour chaque échantillon : 5 µl de 2X TaqMan® Genotyping Master Mix, 0.5 µl de TaqMan® Copy Number Assay 20X, 0.5 µl de TaqMan® Copy Number Reference Assay 20X, 3 µl d'H<sub>2</sub>O et 1 µl d'ADN à 10 ng/µl. La réaction d'amplification a été réalisée dans un appareil de PCR quantitative en temps réel Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR. Les paramètres d'amplification utilisés étaient les suivants : mise en température à 50°C pendant 2 minutes puis dénaturation à 95°C pendant 10 minutes suivi de 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes et hybridation - polymérisation à 60°C pendant 1 minute. Les données ont ensuite été extraites à l'aide du logiciel SDS v1.4 et analysées à l'aide du logiciel CopyCaller.

Tableau 14. Amorces et sondes utilisés pour les expériences TaqMan dans la région *RevSex* en amont du gène *SOX9*.

Cible	Séquenc 5'-3'	Orientation	Sonde
CNV1-SOX9	CAAATGCGCTACCCCTTCTC	Sens	TGCCTAAAATTTCCCCCACT
	GAGCCCATATGACAGCCTCT	Antisens	
CNV2-SOX9	TGTAAACCATTGCCATGCCTATT	Sens	TGGAGAGGGTAGCTTTGTGT
	ATTCCTGCTTCAAGTTACTGCTC	Antisens	
CNV3-SOX9	AGTTTTTCATTGCCAGGAAGAAA	Sens	GAGGAGTCACTGTGCTTCTCT
	GCACTCGTACTCAAAGAATCCAA	Antisens	
CNV4-SOX9	ATACACCTAAAGCCCCAGATCAT	Sens	CTGCAGACTTCTAGGGCAA
	CAGTGTAAGCCTCTACGTGTT	Antisens	
CNV5-SOX9	TCTCAGAATGCAGCCACAATG	Sens	AGCCATTGTCCACTCTCTCT
	TAGGACATGGGGAAAGTGGG	Antisens	

Figure 14. Schéma de la localisation des sondes TaqMan dans la région *RevSex*.

## D. Etude d'exome

Le séquençage d'exome permet d'analyser la séquence codante et les régions introniques flanquantes de l'ensemble des séquences codantes du génome. Ceci est rendu possible par le développement des nouvelles techniques de séquençage massif en parallèle (Next Generation Sequencing - NGS).

La technique d'exome a été réalisée sur une plateforme Illumina par la société SourceBioscience. L'enrichissement d'exon a été préparé à l'aide du kit Agilent SureSelect Human All Exon V4 Paired-end et séquençé sur un séquenceur Illumina HiSeq2000 avec un kit TruSeq v3.

Les fichiers .fastq contenant les *reads* ont été générés à partir de la plateforme de séquençage à l'aide d'un logiciel du fabricant. Les *reads* ont ensuite été alignés sur le génome de référence (GRCh37 ou hg19) à l'aide de l'outil Burrows-Wheeler Aligner (BWA) v0.7.10 permettant d'obtenir des fichiers BAM (Binary Alignment/Map). Les *reads* en duplicate ont été identifiés à l'aide de l'outil Picard v1.107 dans le but de retirer ceux qui seraient liés au biais d'amplification de l'étape de PCR. Les fichiers BAM ont ensuite été traités à l'aide de l'outil SAMtools 0.1.18. Les scores de qualité des bases ont été recalibrés à l'aide de l'outil BaseRecalibrator GATK. Les variants SNP et Indel ont été recherchés à l'aide de Freebayes et comparés à la base de donnée dbSNP138. Les variants ont ensuite été annotés à partir des informations disponibles sur le nom et la fonction du gène dans la base de données Ensembl.

Les paramètres utilisés pour extraire les variants d'intérêt dans l'outil fourni par SourceBioscience étaient les suivants pour les variants : *Quality score* <20, *Population frequency* <0.001, *Severity* : All, *Genotype* : All, *Prediction* :Deleterious, *Variation type* : Any, *Consequence type* : Any/Stop Gain/Stop Loss/Frameshift/Exonic Splice Site. Pour les variants homozygotes les critères utilisés étaient les suivants : *Quality score* <20, *Population frequency* <0.01, *Severity* : Serious, *Genotype* : Homozygote - n/n, *Prediction* : Any, *Variation type* : Any, *Consequence type* : Any.

## E. Outils bioinformatiques

Différents outils bioinformatiques et bases de données ont été utilisés pour la réalisation de ce travail. Ils sont rapportés dans le Tableau 15.

Tableau 15. Ressources bio-informatiques utilisées pour l'élaboration et l'interprétation des données.

Nom	URL/Fabriquant	Commentaires
NCBI	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Inclus PubMed, BLAST, dbSNP, Gene, OMIM
UCSC	<a href="https://genome.ucsc.edu/">https://genome.ucsc.edu/</a>	Genome browser
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org/">http://www.ensembl.org/</a>	Genome browser, données de SNP
GeneCards	<a href="https://www.genecards.org/">https://www.genecards.org/</a>	Données concernant les gènes
Mobyle@Pasteur	<a href="http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::showseq">http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::showseq</a>	Génération de séquences de références
RepeatMasker	<a href="http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker">http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker</a>	Identification des régions répétées du génome
Primer3web	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3/">http://bioinfo.ut.ee/primer3/</a>	Elaboration des amorces pour la PCR-séquence
Primer Premier	Premier Biosoft	Elaboration des amorces pour la QMPSF
SeqScapev2.5	Applied Biosystems	Analyse de séquence
Gene Mapper	Applied Biosystems	Analyse de QMPSF
Genome Studio Genotyping	Illumina	Analyse de puce SNP
Genomic Oligoarray and SNP array evaluation tool	<a href="http://firefly.ccs.miami.edu/cgi-bin/ROH/ROH_analysis_tool.cgi">http://firefly.ccs.miami.edu/cgi-bin/ROH/ROH_analysis_tool.cgi</a>	Identification des gènes
DGV	<a href="https://dgv.tcag.ca/dgv/app/home">https://dgv.tcag.ca/dgv/app/home</a>	Données concernant les CNV
DECIPHER	<a href="https://decipher.sanger.ac.uk/">https://decipher.sanger.ac.uk/</a>	Données concernant les CNV et les phénotypes
VISTA Enhancer Browser	<a href="http://enhancer.lbl.gov/frnt_page_n.shtml">http://enhancer.lbl.gov/frnt_page_n.shtml</a>	Données concernant les régions régulatrices

ECR Browser	<a href="https://ecrbrowser.dcode.org/">https://ecrbrowser.dcode.org/</a>	Données concernant la conservation de séquence
rVista 2.0	<a href="https://rvista.dcode.org/">https://rvista.dcode.org/</a>	Données concernant la conservation de séquence
The Human Protein Atlas	<a href="http://www.proteinatlas.org/">http://www.proteinatlas.org/</a>	Données d'expression tissulaire
ClustalW2 puis Clustal Omega	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>	Outil d'alignement de séquence
Mutation Taster	<a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a>	Outils de prédiction de variant
PolyPhen-2	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>	Outils de prédiction de variant
SIFT	<a href="http://sift.jcvi.org/">http://sift.jcvi.org/</a>	Outils de prédiction de variant
Mutalyzer	<a href="https://mutalyzer.nl/">https://mutalyzer.nl/</a>	Outils de prédiction de variant
GeneSplicer	<a href="http://ccb.jhu.edu/software/genesplicer/">http://ccb.jhu.edu/software/genesplicer/</a>	Outils d'analyse de variant de splice site
NNSplice	<a href="https://omictools.com/nnssplice-tool">https://omictools.com/nnssplice-tool</a>	Outils d'analyse de variant de splice site
Human Splicing Finder	<a href="http://www.umd.be/HSF/">http://www.umd.be/HSF/</a>	Outils d'analyse de variant de splice site
Gene eXpression Database	<a href="http://www.informatics.jax.org/expression.shtml">http://www.informatics.jax.org/expression.shtml</a>	Expression des gènes dans la gonade en développement chez la souris

## IV. Résultats et discussion

### A. Partie I : Recherche de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans le développement testiculaire

Dans le but d'identifier de nouveaux gènes candidats impliqués dans le développement gonadique, nous avons tout d'abord étudié une cohorte de patients présentant un DSD 46,XX avec développement testiculaire ou ovotesticulaire.

#### 1. Etude de la région *RevSex* en amont de *SOX9*

##### a) Redéfinition de la région minimale critique *RevSex* en amont de *SOX9* (Article 1)

L'étude de la cohorte DSD 46,XX avec développement testiculaire ou ovotesticulaire a permis d'identifier trois CNVs pathogènes chez trois patients sur les 18 patients testés. Ces trois CNVs correspondent à des duplications situées en 17q24.3 au niveau de la région *RevSex* décrite précédemment par Benko et al. (Benko et al., 2011). La taille minimale de la duplication identifiée chez les patients T1 et T2 est de 77,1 kb et la taille maximale de 85,2 kb (région minimale dupliquée : 69,493,864-69,570,941 [Hg19]). La duplication identifiée chez le patient T3 est également située en 17q24.3, la région minimale dupliquée est de 140,5 kb et la région maximale de 152,5 kb (région minimale dupliquée : 69,441,277-69,581,849 [Hg19]) et englobe entièrement la duplication des patients T1 et T2 (Tableau 16). Le séquençage des points de cassure de la duplication chez le patient T2 a permis de préciser la taille exacte de la duplication : 69,491,366-69,575,195.

Tableau 16. Description clinique et histologique ainsi que les réarrangements identifiés chez les trois patients.

Patients	Sexe	Age (Années)	Signes cliniques	Histologie des gonades	Nombre de CNVs	Région minimale dupliquée
T1	M	42	Infertilité	Tissu testiculaire sans cellules germinales	4	17:69,493,864-69,570,941
T2	M	41	Infertilité, apparenté du patient T1	Tissu testiculaire sans cellules germinales	4	17:69,493,864-69,570,941
T3	M	48	Infertilité	ND	2	17:69,441,277-69,581,849

Ces duplications sont situées dans la région *RevSex* en amont de *SOX9*. Xiao et al. ont publié en 2013, une duplication de la région d'une taille de 74 kb dont le point de cassure proximal était situé dans l'intervalle suivant : 69,533,305 - 69,534,526 (Xiao et al., 2013). Ces données associées à nos résultats permettent de redéfinir la région minimale dupliquée avec une taille minimale de 40,7 kb et une taille maximale de 41,9 kb. Cette région contient deux possibles *enhancers*. Un premier est situé entre les positions 69,568,380 - 69,569,850. La chromatine dans cette région présente un site de liaison probable de CTCF qui est un élément régulateur de la conformation chromatinienne facilitant ainsi les interactions entre des séquences régulatrices de transcription (Murrell, 2011). Cette région contient également des marques épigénétiques habituellement associées à une activation génique : monométhylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me1) et acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27ac) (Eissenberg and Shilatifard, 2010; Smith and Shilatifard, 2014). Par ailleurs, un second *enhancer* situé à la position 69,544,206 - 69,546,005 et qui contient également des marques d'activation géniques contient un site de fixation de la protéine EP300, une histone acétyltransférase co-activatrice de l'expression génique dépendante de *SOX9* (Furumatsu et al., 2009). Un alignement multi-espèce montre la présence de 12 éléments conservés et en particulier des éléments de liaison pour des facteurs fortement exprimés dans le testicule de souris au moment de la détermination de la gonade tel que NFIL3, PBX1 et GATA1. Il existe également des sites de fixation à l'ADN pour des facteurs de transcription impliqués dans le développement précoce de la gonade : WT1, SOX9, NR5A1 et LHX9 et également quatre sites de fixation pour le facteur de transcription DMRT1.

**b) Etude de la région *RevSex* dans la cohorte DSD 46,XY et DSD 46,XX**

L'identification de la duplication en amont de *SOX9* chez les patients T1 et T2 a donc permis de redéfinir la région minimale impliquée dans les cas de DSD 46,XX avec développement testiculaire. Afin d'évaluer l'implication de ce remaniement chromosomique et redéfinir plus précisément la région, une cohorte de patients présentant soit un DSD 46,XY avec CGD ou un DSD 46,XX avec un développement testiculaire a été étudiée par PCR quantitative (qPCR) pour rechercher des cas de délétion chez les patients DSD 46,XY et de duplication chez les cas de DSD 46,XX.

**Caractéristiques de la cohorte**

Cette cohorte est constituée de 11 patients ayant un DSD 46,XY et de treize patients ayant DSD 46,XX avec un développement testiculaire. Parmi les 11 patients présentant un DSD 46,XY, dix d'entre eux ont une CGD ou une PGD et un patient présente une anorchidie.

Tableau 17. Description de la cohorte P testée pour la recherche d'un remaniement de la région minimale RevSex

Patient	Caryotype	Phénotype
P1	XX	Male
P4	XY	CGD
P7	XX	Male
P10	XY	PGD
P13	XX	Male
P16	XY	DSD
P23	XX	Male
P35	XX	Male
P41	XY	DSD
P42	XX	Male
P43	XX	Male
P46	XX	Male
P47	XX	Male
P49	XY	DSD
P50	XY	DSD
P52	XX	Male
P53	XX	Male
P54	XY	CGD
P55	XY	Anorchidie
P56	XX	Male
P61	XY	CGD
P64	XY	DSD
P66	XX	Male
P67	XY	CGD

## Résultats de qPCR

Quatre qPCR TaqMan nommées CNV1-SOX9 à CNV4-SOX9 ont été réalisées initialement dans la région minimale dupliquée puis une 5<sup>ème</sup> (CNV5-SOX9) a été testée couvrant un locus situé entre les locus CNV2 et CNV3. Le patient T1 a été utilisé comme témoin positif de la duplication.

L'interprétation a été possible pour les qPCR CNV1 et CNV4 uniquement. Pour les qPCR CNV2, CNV3 et CNV5, le résultat du patient T1 qui servait de témoin montrait 2 copies seulement. Les résultats pour les CNV1 et 4 sont rapportés dans la Figure 15.

Figure 15. Résultats de qPCR TaqMan pour les CNV1-SOX9 et CNV4-SOX9.



Les résultats de qPCR TaqMan montrent la présence de trois copies des loci CNV1 et CNV4 pour chaque technique chez le patient P35 faisant suspecter une duplication de la région. En revanche, une seule copie des loci CNV1 et CNV4 est retrouvée pour les patients P54 et P55 faisant suspecter une délétion de la région. De manière intéressante, le patient 42 présente une duplication du locus CNV1 et une délétion du locus CNV4. Deux patients (P16 et P23) présentent une duplication uniquement du locus CNV1 et un patient (P47) présente une délétion du locus CNV4 uniquement. Enfin, le patient P4 présente une discordance pour le CNV1 puisque dans une technique il y a la présence de deux copies et dans l'autre technique la présence de trois copies. Concernant le CNV4, il semble y avoir trois copies.

La vérification par puce SNP Illumina a permis de confirmer la duplication chez le patient P35 (Figure 16). La région minimale dupliquée est de 179,4 kb (région minimale

dupliquée : chr17: 69,515,705 - 69,695,133). Cette duplication est plus grande que la région minimale dupliquée déjà identifiée. Concernant le patient P4 et P42, la puce n'a pas confirmé la duplication. La qualité d'ADN n'a malheureusement pas permis l'interprétation de la puce pour les patients P16, P23, P54 et P55.

Au total, dans une cohorte de 24 patients, nous avons pu confirmer une duplication chez un patient ayant un DSD 46,XX avec un développement testiculaire. Il existe une forte probabilité que deux patients ayant un DSD 46,XY avec une CGD et une anorchidie aient une délétion de la région RevSex.

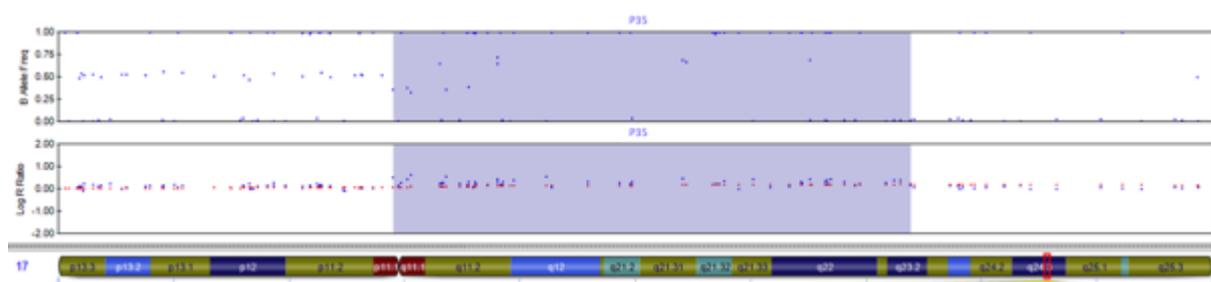


Figure 16. Profil SNP array de la région 17q24.3 chez le patient P35 montrant une augmentation du logR et l'apparition d'une fréquence de l'allèle B de 0.33 et 0.66.

### c) Discussion

L'identification de deux duplications à environ 600 kb en amont de *SOX9* chez trois patients de notre cohorte DSD 46,XX nous a permis de redéfinir la région minimale critique nécessaire pour l'activation de *SOX9* chez des patients 46,XX avec développement testiculaire à une taille comprise entre 40,6 et 41,9 kb. Cependant le mécanisme par lequel le réarrangement de cette région entraîne l'activation de *SOX9* n'est pas complètement identifié.

La région minimale dupliquée contient un motif *enhancer* capable de lier l'histone acétyl-transférase EP300, un régulateur de la transcription par le biais du remodelage de la chromatine. Ce facteur est important pour la prolifération cellulaire et la différenciation (Ogryzko et al., 1996). EP300 est fortement exprimé dans les cellules somatiques et les cellules germinales des embryons XX et XY au moment de la détermination gonadique et peut être un co-activateur de NR5A1 et SOX9 (Furumatsu et al., 2009; Ito et al., 1998;

Munger et al., 2013). Il est possible que l'expression de *SOX9* soit régulée par cet élément et impliquant à la fois SF1 et EP300. Par ailleurs, cet *enhancer* est situé entre deux sites possibles de fixation de DMRT1. DMRT1 contrôle de multiples aspects du développement testiculaire chez la souris et chez l'homme. Il est impliqué notamment dans la différenciation, la prolifération, la migration et le maintien de la pluripotence des cellules germinales ainsi que dans la prolifération et la différenciation des cellules de Sertoli (Matson and Zarkower, 2012). Chez l'homme, l'haploinsuffisance de *DMRT1* est responsable d'anomalies du déterminisme de la gonade chez les patients 46,XY tandis que chez la souris, il joue un rôle essentiel dans le maintien du déterminisme testiculaire en antagonisant les gènes du développement ovarien (Matson et al., 2011; Ottolenghi and McElreavey, 2000). Chez les oiseaux en revanche, DMRT1 est nécessaire à l'expression de *SOX9*, faisant de celui-ci le meilleur gène candidat pour le déterminisme testiculaire (Lambeth et al., 2014; Smith et al., 2009). Des études de ChIPseq sur des cellules testiculaires de souris au stade P28 montrent que DMRT1 se fixe en amont et en aval de *Sox9* ainsi qu'à proximité des gènes *Wnt4*, *Foxl2* et *Rspo1* suggérant que DMRT1 peut initier ou maintenir la différenciation testiculaire en activant directement *Sox9* et en réprimant les gènes de la voie du déterminisme féminin (Matson et al., 2011; Murphy et al., 2010). C'est pourquoi la localisation de sites de fixation de DMRT1 au sein d'un probable élément *enhancer* dans la région *RevSex* ouvre la possibilité que le développement testiculaire associé à ces duplications se fasse par l'intermédiaire de DMRT1.

Nous avons dans une deuxième partie étudié par qPCR une cohorte de patients présentant un DSD 46,XX ou un DSD 46,XY dans le but d'identifier de nouveaux patients avec un remaniement de la région *RevSex*. Initialement, quatre qPCR TaqMan ont été réalisées mais les résultats obtenus pour les CNV2 et CNV3 ont été systématiquement erronés. En effet, la reproduction de la technique de manière indépendante a mis en évidence à chaque fois deux copies de la région chez le patient témoin alors qu'il y a bien trois copies identifiées en puce SNP. Il est difficile d'expliquer cette discordance de résultat. En effet, les amorces utilisées pour ces deux qPCR sont bien situées dans la région *RevSex* et ont été choisies en dehors de régions répétées. L'utilisation d'une troisième qPCR TaqMan entre les CNV2 et CNV3 a mené exactement au même résultat. En revanche les qPCR pour les CNV1 et CNV4 situés à proximité des bornes de la duplication chez notre patient témoin a montré la présence de trois copies dans chaque expérience rendant les résultats interprétables. Nous avons donc mis en évidence un remaniement chez trois patients mais seul un remaniement a

pu être confirmé du fait d'un défaut de qualité de l'ADN pour les deux patients. En prenant ces résultats avec ceux de la cohorte DSD 46, XX avec développement testiculaire, on peut évaluer que les remaniements de la région *RevSex* permettent d'expliquer au moins 10% des cas de DSD avec anomalie du développement de la gonade (DSD 46,XX et DSD 46,XY). Ceci est en adéquation avec la littérature récente puisque Vetro et al. ont également identifié un remaniement de cette région dans 10,5% des cas de DSD 46,XX avec développement testiculaire de leur cohorte (Vetro et al., 2015).

Au total les remaniements de la région *RevSex* sont responsables d'environ 10% des cas de DSD 46,XX SRY- avec développement testiculaire. Cependant d'autres études sont nécessaires afin d'identifier les mécanismes précis responsables du développement testiculaire.

## **2. Cohorte DSD 46,XX**

### **a) Caractéristiques de la cohorte**

La cohorte de patients pour cette étude était constituée de 18 patients dont les trois patients rapportés précédemment. Ils ont été recrutés au sein du laboratoire de cytogénétique de l'hôpital Trousseau, suite au résultat de leur caryotype ou de l'étude de microdélétion du chromosome Y pour cinq patients. Trois échantillons de patients ont été adressés par les services de génétique des hôpitaux d'Angers, Montpellier et Poitiers suite à l'obtention d'un caryotype 46,XX associé à l'absence du locus *SRY* en *FISH*. Dix patients ont été adressés par le service d'endocrinologie pédiatrique de l'hôpital Robert Debré. Les caractéristiques cliniques de cette cohorte sont rapportées dans le Tableau 18.

Tableau 18. Caractéristiques cliniques de la cohorte DSD 46,XX.

Patients	Sexe	Age (Années)	Signes cliniques	Histologie des gonades
T4	M	4	A 1 mois : bourgeon génital de 27x10 mm, bourrelets génitaux striés et fusionnés, hypospadias pénien 1/3 moyen, gonades intra-scrotales	ND
T5	M	4	Infertilité	ND
T6	M	5	Bourgeon génital de 45x20 mm, hypospadias pénoscrotal, bourrelets génitaux striés et pigmentés fusionnés en postérieur, gonades intrascrotales	Ovotestis bilatéral avec des tubes séminifères sans cellules germinales et des follicules ovariens contenant un ovocyte sans limite nette
T7	M	24	Infertilité	ND
T8	M	33	Infertilité	ND
T9	M	16	A 16 ans : bourgeon génital de 40 mm, bourrelets génitaux striés, pigmentés et fusionnés, hypospadias périnéal	ND
T10	M	16	Bourgeon génital de 40 mm très coudé, bourrelets génitaux hyperplasiques non plissés, non pigmentés, hypospadias périnéal, gonades intra-abdominales	Ovotestis bilatéral avec 80-90% de tissu ovarien et 10-20% de tissu testiculaire avec une limite assez nette
T11	M	6	A la naissance : bourgeon génital de 32 mm coudé, bourrelets génitaux striés, pigmentés et fusionnés, orifice unique périnéal, gonades intra-scrotales	Tissu testiculaire avec tubes séminifères et probables cellules de Leydig
T12	F	1	A la naissance : bourgeon génital de 25 mm, bourrelets génitaux striés, pigmentés et fusionnés en postérieur, orifice unique périnéal Présence d'un utérus et un vagin	ND
T13	M		Infertilité	ND
T14	F	1	A la naissance : bourgeon génital de 28x15 mm, bourrelets génitaux striés, pigmentés et fusionnés, 2 orifices périnéaux, gonades intra-abdominales	Ovotestis bilatéral, tissu testiculaire majoritaire avec un croissant en périphérie de tissu ovarien
T15	M	16	A 6 ans : bourgeon génital de 45x20 mm, bourrelets génitaux non fusionnés, 1 orifice unique vulviforme, gonades intra-abdominales Présence de résidus mullériens	Gonade droite : ovotestis Gonade gauche : ovaire et résidus mullériens
T16	F	20	A 15 ans : bourgeon génital de 60x35 mm, bourrelets génitaux striés, pigmentés, fusionnés au 1/3 supérieur, 2 orifices, gonades intra-abdominales	Gonade gauche : ovaire sur biopsie Gonade droite : ovotestis avec limite nette
T17	F	10	A la naissance : bourgeon génital de 25x12 mm coudé, bourrelets génitaux fusionnés en postérieur, orifice unique périnéal, gonade droite inguinale, gonade gauche intra-abdominale	Gonade gauche : ovaire Gonade droite : ovotestis
T18	F	10	A la naissance : bourgeon génital 20x11 mm, bourrelets génitaux pigmentés et plissés non fusionnés en postérieur, 2 orifices à la base du bourgeon génital, gonades intra-abdominales	Gonade droite : ovotestis avec présence de follicules primordiaux et tubes séminifères matures

**b) Résultats**

**(a) Étude pangénomique par puce SNP**

Nous avons étudié cette cohorte par puce SNP pour rechercher des microremaniements et des ROHs (Regions of homozygosity). Les ROHs correspondent à des régions du génome où les deux copies héritées des parents sont identiques, chez les patients consanguins.

L'étude a mis en évidence 95 CNVs chez l'ensemble des patients avec un nombre moyen de 6,5 CNVs par patient et une taille moyenne de 64.1 kb. Aucun gène candidat n'a été mis en évidence dans ces 95 CNVs. En effet, ils étaient soit répertoriés dans les bases de données comme polymorphismes soit situés dans des régions non codantes sans gène d'intérêt dans un intervalle de 1 Mb en amont ou en aval du CNV. Un résumé des résultats est rapporté dans le Tableau 19 et l'ensemble des CNVs identifiés est rapporté dans l'Annexe 1.

Par ailleurs, l'étude a montré la présence de plusieurs ROHs supérieurs à 2 Mb chez sept patients. Le nombre de régions de ROHs ainsi que les gènes d'intérêt en rapport avec le développement gonadique sont rapportés dans le Tableau 19.

Tableau 19. CNVs identifiés dans la cohorte DSD 46,XX avec développement testiculaire.

Patients	Nombre de CNVs	Nbe ROH>2Mb (Taille totale)	Gènes d'intérêt dans les ROH
T4	1	-	-
T5	1	-	-
T6	4	-	-
T7	3	-	-
T8	3	-	-
T9	4	-	-
T10	2	2 (5Mb)	-
T11	22	26 (313 Mb)	FOXL2
T12	6	1 (4Mb)	-
T13	2	-	-
T14	18	9 (38 Mb)	CYP19A1
T15	9	-	-
T16	6	3 (15 Mb)	-
T17	8	6 (21 Mb)	RSPO2
T18	6	2 (5 Mb)	-

Nous avons également recherché s'il existait des régions communes de ROHs chez ces patients. Sept régions minimales communes ont été trouvées, elles sont rapportées dans le Tableau 20. Aucun gène d'intérêt n'a été identifié dans ces régions communes.

Tableau 20. Régions de ROH communes à au moins deux patients.

Patients	Région minimale commune	Taille de la région (pb)	Nombre de gènes
T12/T14	chr6:57217336-57776162	558,827	10
T12/T14/T18	chr6:61891638-63173804	1,282,167	3
T10/T12	chr14:66620128-67658895	1,038,768	3
T11/T17	chr18:62517764-64898982	2,381,219	6
T12/T16	chrX:48349873-49419664	1,069,792	56
T14/T16	chrX:64698852-67089063	2,390,212	22
T12/T14/T18	chrX:74111360-76059596	1,948,237	21

**(b) Étude d'exome**

Dix patients de la cohorte ont eu également une analyse d'exome. Le nombre de variants identifiés et les gènes d'intérêt pour chaque patient sont rapportés dans le Tableau 21. Concernant le patient T11, l'analyse de l'exome n'a pas montré de variants dans le gène *FOXL2*. Pour le patient T13, l'analyse a montré la présence de séquences s'alignant sur le chromosome Y. L'analyse par PCR classique n'avait pas montré la présence de séquence de *SRY*.

Tableau 21. Nombres de variants identifiés lors du séquençage d'exome pour les 10 patients de la cohorte DSD avec développement testiculaire.

Patient	Nombre de variants Hétérozygotes/Homozygotes	Gènes d'intérêt	Séquences du chromosome Y
T4	957/2289	-	Non
T5	885/2222	-	Non
T6	1052/2430	-	Non
T7	833/2060	-	Non
T8	2104/2447	LGR5 p.V885M+/ (c.2653G>A:A)	Non
T9	1127/2483	-	Non
T10	1113/2430	-	Non
T11	1235/2724	-	Non
T12	1063/2377	-	Non
T13	783/2168	-	Oui

### c) Discussion

Nous avons analysés 18 patients ayant un DSD 46,XX avec développement testiculaire ou ovotesticulaire à l'aide d'une plateforme SNP permettant de mettre en évidence des microremaniements et des régions d'homozygotie. La majorité des CNVs identifiés correspondent à des polymorphismes rapportés dans les bases de données. Trois CNVs concernant la région *RevSex* ont été rapportés précédemment et aucun autre CNV n'a été mis en évidence dans cette étude. En revanche, il existait des régions d'homozygotie > 2 Mb chez sept patients. Le développement gonadique est un processus finement régulé avec une balance permanente entre des facteurs pro-testiculaires et pro-ovariens. La plupart des gènes déjà impliqués dans les DSD sont des gènes dont l'altération d'une seule copie entraîne un déséquilibre de la balance conduisant à une anomalie du développement de la gonade chez l'homme (Eggers and Sinclair, 2012). Cependant, concernant *RSPO1* l'altération des deux copies est nécessaire pour avoir un développement testiculaire chez des patients 46,XX (Parma et al., 2006). L'utilisation d'une puce SNP permettant de mettre en évidence des régions d'homozygotie est un bon outil pour identifier des gènes dont l'altération des deux copies serait responsable d'un phénotype anormal. L'étude de ces régions de ROH a mis en évidence trois gènes d'intérêt.

Le gène *FOXL2* est impliqué dans la différenciation des cellules de la granulosa. Les souris *Foxl2*<sup>-/-</sup> n'ont pas d'anomalie de développement gonadique mais uniquement des anomalies de la folliculogénèse (Uda, 2004). De la même manière chez l'homme, les mutations hétérozygotes ou homozygotes sont responsables du syndrome BPES de type I ou de type II mais également d'IOP non syndromique. Le séquençage de ce gène dans une cohorte de 23 patients ayant un DSD 46,XX SRY- avec développement testiculaire n'avait pas montré de mutation (De Baere et al., 2002). Le patient T11 ayant eu une analyse complémentaire par séquençage d'exome aucun variant dans le gène *FOXL2* n'a été identifié. Ceci nous incite à conclure que *FOXL2* n'est probablement pas un gène impliqué dans le développement testiculaire chez les hommes 46,XX SRY-.

Le gène *CYP19A1* code pour l'aromatase une enzyme nécessaire à la synthèse des œstrogènes à partir des androgènes. Les mutations homozygotes de *CYP19A1* sont associées à un taux élevé d'androgènes et un déficit en œstrogènes (Harada et al., 1992). Chez les fœtus de sexe chromosomique féminin, l'excès d'androgènes est responsable de la virilisation des

organes génitaux externes et pourrait donc donner un phénotype clinique comparable à celui retrouvé chez cette patiente (T14) (Bulun, 1996). Cependant l'étude histologique des gonades a montré la présence de tissu testiculaire ce qui n'est pas le cas dans les déficits en aromatasase. L'analyse de la séquence codante par PCR-séquence avait été réalisée avant le résultat de l'étude histologique des gonades et a logiquement montré l'absence de mutations.

Le gène *RSPO2* appartient à la famille des R-spondines comme le gène *RSPO1* qui est un acteur majeur du développement ovarien. Les protéines de la famille des R-spondines sont des activateurs de la voie WNT/  $\beta$ -caténine. Les membres de cette famille partagent entre 40% et 60% d'homologie (Figure 17). Le gène *RSPO2* a tout d'abord été impliqué dans la myogenèse chez *Xenopus* et des études récentes montrent son rôle dans l'ossification via la voie de signalisation WNT/  $\beta$ -caténine et ses récepteurs LGR4 à LGR6 (Kazanskaya et al., 2004; Takegami et al., 2016; Zhu et al., 2016). L'étude de l'expression de *Rspo2* chez l'embryon de souris montre qu'il n'est pas exprimé dans les crêtes génitales ou dans la gonade à la différence de *Rspo1*. Ce gène ne semble pas être un gène impliqué dans le développement gonadique chez les mammifères.

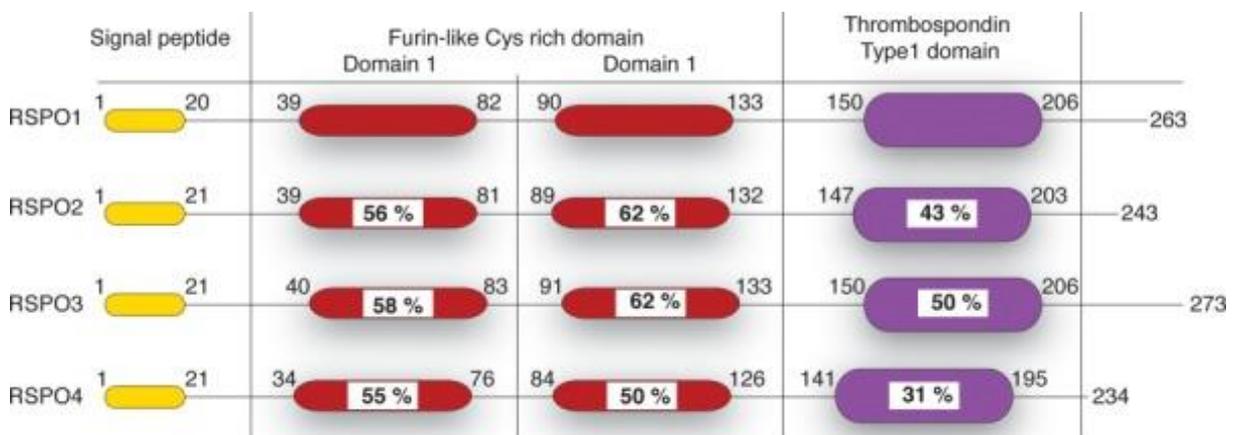


Figure 17. Schéma de la structure des différents membres de la famille des protéines R-spondines.

Le pourcentage d'homologie par rapport à RSPO1 est indiqué pour chaque domaine (d'après (Kumar et al., 2014)).

Le développement des techniques de séquençage massif en parallèle a permis de faire des avancées dans le diagnostic et l'identification de nouveaux variants et de nouveaux gènes en pathologie et en particulier dans les DSD. Différentes approches sont possibles actuellement allant du séquençage de panel ciblé jusqu'au séquençage entier du génome (WGS). Nous avons réalisé chez 11 patients, une étude de l'exome qui correspond aux régions codantes du génome soit 1 à 2% du génome uniquement. Toutes les régions non codantes ne sont pas analysées mais jusqu'à maintenant la majorité des variants identifiés responsables de pathologies concernent les régions codantes (Tobias and McElreavey, 2014). Les techniques de séquençage d'exome permettent de mettre en évidence des SNVs (Single Nucleotide Variations) ou bien des insertions et délétion (indels). L'analyse de la couverture et de la profondeur de séquençage permet également d'identifier des CNVs (Wang et al., 2014a; Zhao et al., 2013). Nous avons mis en évidence chez un patient la présence de séquence du chromosome Y alors que des PCRs ciblant SRY, AZFa, AZFb et AZFc n'avait pas mis en évidence d'amplification. Des études en NGS ont permis de mettre en évidence des mutations en mosaïque très faible (jusqu'à 5%) qui n'avaient pas été identifiées par les techniques classique de Sanger (Qin et al., 2016). Le résultat retrouvé chez notre patient fait évoquer une chimère avec la présence de deux lignées cellulaires différentes provenant de la fusion de deux embryons 46,XX et 46,XY. Plusieurs cas de chimère 46,XX/46,XY ont été rapportés dans la littérature, le diagnostic ayant été fait grâce au caryotype. La présentation clinique chez les patients ayant un tel caryotype est très variable, allant d'un phénotype masculin normal ou féminin normal à la présence d'anomalies de la différenciation des organes génitaux externes (Bromilow and Duguid, 1989; Freiberg et al., 1988; Hadjiathanasiou et al., 1994; Malan et al., 2007). Dans une étude récente, il a été montré qu'un caryotype 46,XX/46,XY était retrouvé dans environ 1% des cas de DSD (Cox et al., 2014). Différents mécanismes permettent d'expliquer la formation d'une chimère (Malan et al., 2006). Dans le cas de ce patient, on peut évoquer une chimère par fécondation de l'ovocyte et du globule polaire (E. dans la Figure 18). La lignée cellulaire contenant le chromosome Y serait majoritairement située au niveau des gonades permettant un développement testiculaire. L'azoospermie retrouvée chez ce patient peut s'expliquer par le fait que les cellules germinales proviennent de la lignée cellulaire 46,XX et donc dépourvue des facteurs AZF permettant le développement des spermatozoïdes. Afin de pouvoir confirmer ce résultat, il serait nécessaire de réaliser une biopsie testiculaire chez le patient. Ce résultat laisse penser que des chimère

avec une lignée XY à un taux très faible pourraient être responsables de DSD 46,XX avec développement testiculaire.

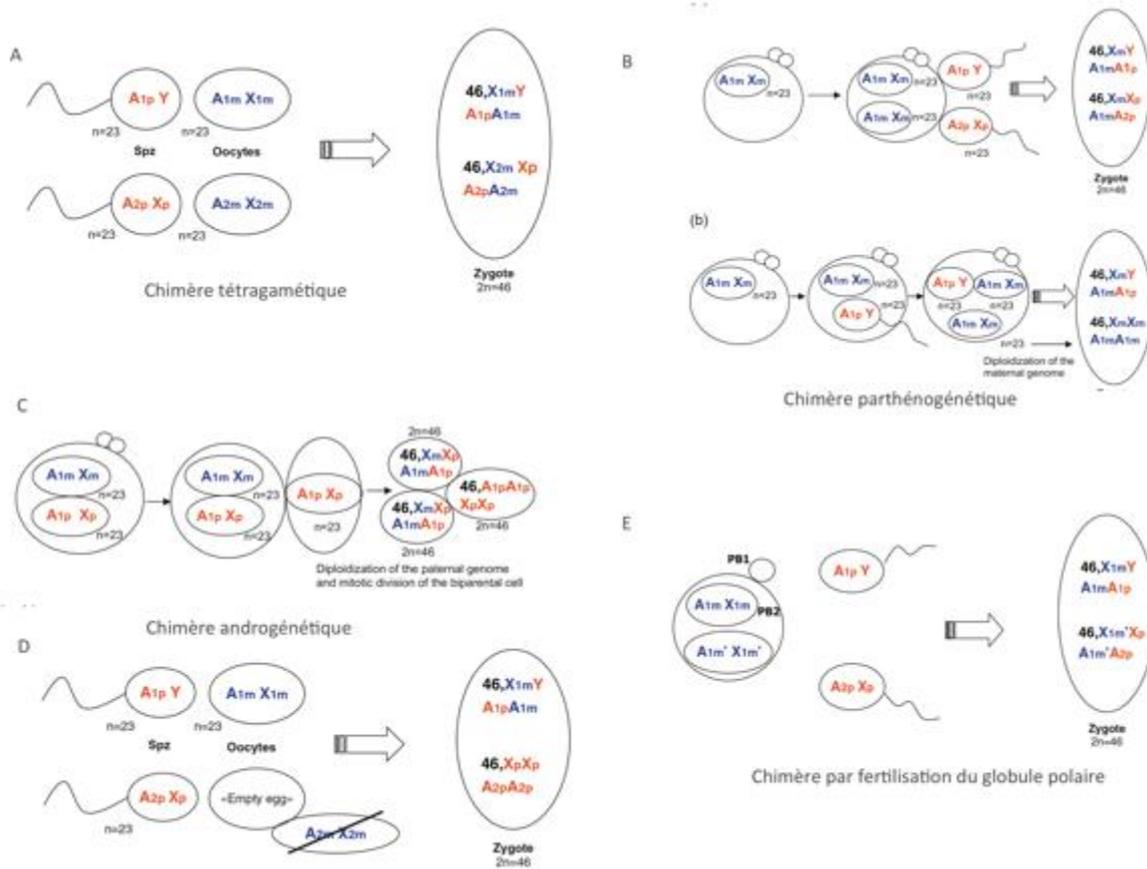


Figure 18. Mécanisme de formation des chimères d'après Malan et al. (Malan et al., 2006).

Par ailleurs, la variation p.V885M (c.2653G>A) dans le gène *LGR5* (NM\_003667.3) a été mise en évidence à l'état homozygote chez le patient T8. Le gène *LGR5* (*leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5*) code pour une protéine appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G (GPCR). C'est un récepteur des R-spondines qui est donc impliqué dans la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine. Cette variation n'a été retrouvée que 39 fois sur les 5005 allèles séquencés et le génotype homozygote AA n'a jamais été observé dans les études 1000 génomes. Cette variation n'est pas située dans le site de fixation au ligand ou dans un des domaines transmembranaires. Elle est située dans la région C-terminale de la protéine dans la région intra-cellulaire après le dernier domaine transmembranaire (Figure 19). L'analyse *in silico* de cette variation ne semble pas être délétère (score SIFT = 0,22, score 106

Polyphen = 0,007). Les études chez la souris montrent une expression de LGR5 au niveau de la gonade féminine spécifiquement à partir de 12,5 dpc puis au niveau du stroma mesenchymateux de l'ovaire et des cellules germinales à 13,5 dpc (Hermeijer et al., 1999; Nef et al., 2005). Des études ont montrées que LGR5 est capable de fixer RSPO1 spécifiquement, permettant l'activation de la voie WNT/ $\beta$ -caténine (Carmon et al., 2012). En revanche, l'absence d'expression de LGR5 chez la souris est responsable d'anomalies du développement mandibulaire et de la face conduisant à une létalité néonatale mais aucun phénotype gonadique n'est observé (Morita et al., 2004). L'ensemble de ces données suggèrent que LGR5 pourrait être un gène candidat pour le développement ovarien mais des études complémentaires seraient nécessaire pour établir son rôle dans la survenue d'un DSD 46,XX avec développement testiculaire.

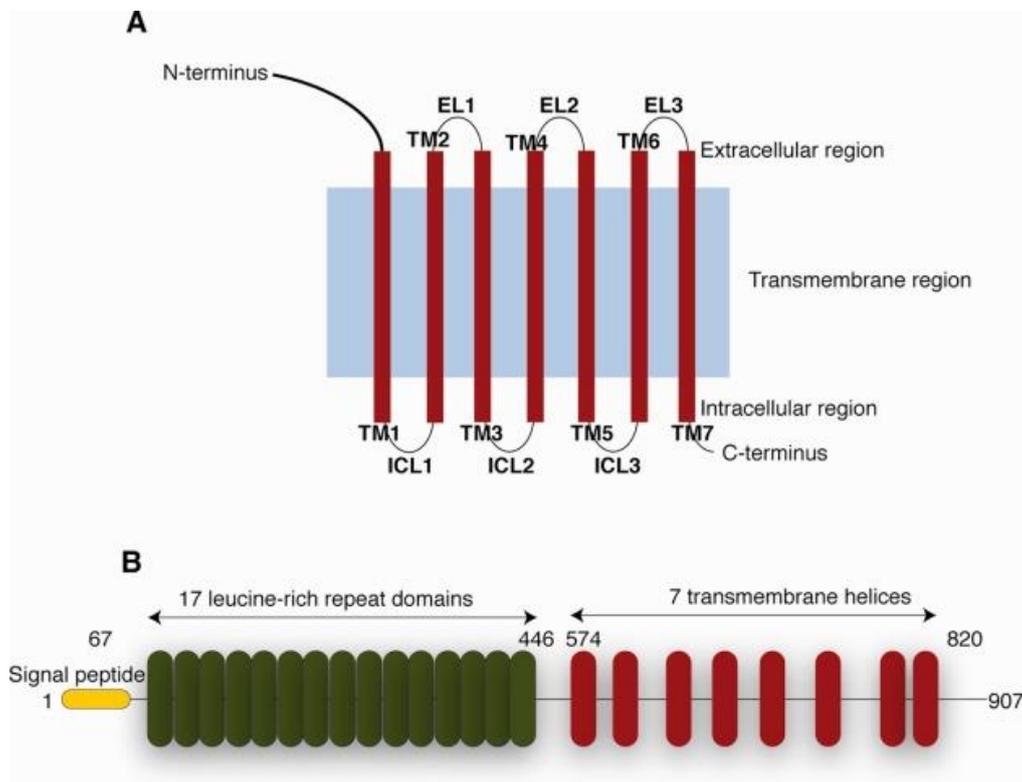


Figure 19. Schéma de la protéine LGR5

A. Représentation globale de la structure de la protéine transmembranaire.

B. Structure de la protéine avec dans la région 5' le peptide signal (en jaune), suivie par les 17 domaines LRR (leucin-rich repeats) (en vert) puis les sept domaines transmembranaires (en rouge), (d'après (Kumar et al., 2014)).

## B. Partie II : Recherche de nouveaux gènes impliqués dans l'IOP

Afin d'identifier des remaniements chromosomiques et des gènes candidats responsables de la survenue d'une insuffisance ovarienne prématurée, les patientes consultant en endocrinologie ont une étude du caryotype et une étude par puce à ADN au sein du laboratoire.

### 1. Etude du gène *CPEB1* (Article 2)

L'étude par puce SNP chez une patiente présentant une aménorrhée primaire associée à une déficience intellectuelle progressive a mis en évidence la présence de huit CNVs (Tableau 22). L'étude approfondie de ces CNVs a permis de mettre en évidence un gène candidat responsable de l'IOP chez cette patiente, le gène *CPEB1* située en 15q26.2.

Tableau 22. CNVs identifiés chez le cas index (patiente 1).

Interprétation	Type de remaniement	Localisation	Taille	Formule
Likely benign	Duplication	<b>2:</b> 218 551 751 - 219 067 865	516,1 Kb	arr[hg19] 2q35(218,551,751-219,067,865)x3
Benign	Duplication	<b>3:</b> 2 038 992 - 2 200 873	161,9 Kb	arr[hg19] 3p26.3(2,038,992-2,200,873)x3
Benign	Duplication	<b>3:</b> 2 829 097 - 3 124 328	295,2 Kb	arr[hg19] 3p26.2(2,829,097-3,124,328)x3
Benign	Duplication	<b>5:</b> 32 110 735 - 32 158 429	47,7 Kb	arr[hg19] 5p13.3(32,110,735-32,158,429)x3
Benign	Deletion	<b>8:</b> 7 169 491 - 7 786 708	617,2 Kb	arr[hg19] 8p23.1(7,169,491-7,786,708)x1
Benign	Duplication	<b>8:</b> 13 558 024 - 13 828 384	270,4 Kb	arr[hg19] 8p22(13,558,024-13,828,384)x3
Benign	Duplication	<b>11:</b> 55 377 911 - 55 450 788	72,9 Kb	arr[hg19] 11q11(55,377,911-55,450,788)x3
Pathogenic	Deletion	<b>15:</b> 83 214 013 - 85 728 844	2 514,8 Kb	arr[hg19] 15q25.2q25.3(83,214,013-85,728,844)x1

---

a) ***CPEB1***

Le gène *CPEB1* (*cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1*) code pour une protéine appartenant à la famille des protéines de liaison à l'élément de polyadénylation cytoplasmique. Ces protéines se fixent sur une séquence d'ARN appelée *cytoplasmic polyadenylation element* (CPE) situé dans la région 3'UTR de certains ARNm. *CPEB1* permet la régulation de la transcription d'ARNm ainsi que le *processing* de ces ARNm au niveau nucléolaire ou cytoplasmique.

Les études chez la souris ont montré que *CPEB1* joue un rôle dans le développement ovarien. En effet, les souris femelles *KO* pour *Cpeb1* présentent toutes une infertilité. L'étude anatomique et histologique montre soit une absence d'ovaire soit la présence d'ovaires rudimentaires dépourvus d'ovocytes (Tay and Richter, 2001). L'étude des ovaires chez des embryons de souris à 18,5 dpc ne met pas en évidence de différence de taille ou de morphologie, en revanche, l'analyse histologique révèle l'absence d'ovocytes au stade pachytène et diplotène qui sont nombreux habituellement à ce stade chez les souris *WT*. Les auteurs ont donc ensuite examiné des ovaires à 16,5 dpc, ils ont identifié la présence d'ovocytes au stade pachytène mais dont les noyaux présentent un ADN fragmenté. L'observation de ces noyaux contenant de l'ADN fragmenté au stade pachytène suggère que *CPEB1* régule la traduction d'ARNm critiques pour la poursuite de la méiose. Plusieurs de ces ARNm critiques correspondent aux protéines du complexe synaptonémal (SYCP1, SYCP2 et SYCP3) qui est responsable du maintien des chromosomes homologues au stade pachytène. Les auteurs ont montré le rôle de *CPEB1* dans la polyadénylation et la régulation de la traduction de SYCP1 et SYCP3 nécessaire à la mise en place du complexe synaptonémal et à la différenciation des cellules germinales chez la souris.

Le phénotype des souris *Cpeb*<sup>-/-</sup> étant similaire à celui des patientes présentant une IOP, nous avons étudié le gène *CPEB1* dans une cohorte de patientes ayant une aménorrhée primaire ou secondaire.

**b) Séquençage du gène *CPEBI***

La séquence codante et les régions introniques flanquantes du gène *CPEBI* ont été analysées par une technique de séquençage Sanger classique dans une cohorte de 95 patientes ayant soit une aménorrhée primaire soit une aménorrhée secondaire. Cette analyse a mis en évidence 21 polymorphismes déjà décrits dans les bases de données (Tableau 23). En revanche, aucun nouveau variant n'a été identifié. De manière intéressante, 27 patientes présentaient une homozygotie pour l'ensemble de leur polymorphismes ou bien aucun polymorphisme. Afin de déterminer s'il n'existait pas une délétion d'un allèle chez ces patientes, une étude quantitative par QMPSF a été réalisée dans un second temps.

Tableau 23. Polymorphismes identifiés dans le gène *CPEBI* dans la cohorte de 95 patientes présentant une aménorrhée primaire ou secondaire.

Variation	polymorphisme	Nombre d'individus Hét/Hom	population	MAF
c.10C>T (p.Pro4Ser)	rs372164501	1/0	ESP6500:European_American	0,002
c.15+81C>A:	rs182071420	2/0	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,013
c.16-13T>C	rs144574454	2/0	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,013
c.61G>A (p.Ala21Thr)	rs61733713	1/0	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,010
c.190+116C>T	rs138778202	2/0	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,005
c.191-11T>G	rs783544	29/55	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,196
c.191-14C>T	rs138210706	1/0	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,001
c.191-22G>A	rs73436995	3/0	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,013
c.378G>A	rs201493089	1/0	ESP6500:European_American	0,000
c.607-36G>A	rs137878127	1/0	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,040
c.783G>A	rs1145171	93/0	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,005
c.974-141insA	rs11390316	24/8	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,179
c.974-35C>T	rs117970733	2/0	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,013
c.1064-26G>T		28/9	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,182
c.1064-24G>C	rs117172003	1/0	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,005
c.1495-17delT	rs35309965	1/0	ESP6500:European_American ESP6500:African_American	0,000 0,014
c.1495-53C>T	c.1530A>G:A/G	3/0	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,002
c.1515A>G	rs1267657	39/17	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,421
c.1575+28C>T	rs142217377	1/0	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,013
c.1575+57G>A	rs62009918	21/7	01000GENOMES:phase_1_ALL	0,113
c.*63C>T	rs2303846	14/4	YUSUKE:JBIC-allele	0,206

## c) QMPSF

Pour cette analyse, trois exons du gène *CPEB1* étaient étudiés : exon 3, exon 4 et exon 12. L'analyse a mis en évidence la présence d'une délétion des trois exons chez la patiente I2 (Figure 20). Cette délétion a été confirmée par une étude en puce SNP qui a montré la présence d'une délétion d'une taille identique à celle retrouvée chez la première patiente (région minimale délétée : 83,213,963 - 85,728,834).

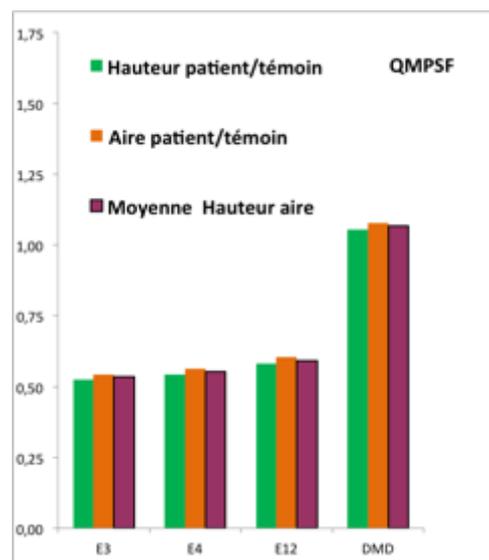


Figure 20. Résultat de l'analyse par QMPSF pour la patiente 2 montrant une délétion des trois exons testés de *CPEB1*: E3, E4 et E12. Le gène *DMD* codant pour la dystrophine située sur le chromosome X sert de témoin.

Nous avons donc poursuivi cette étude par l'analyse en QMPSF de 97 nouvelles patientes présentant une aménorrhée primaire ou secondaire mais aucune nouvelle délétion n'a été mise en évidence dans ce groupe.

**d) Déletion de *CPEB1* dans un cas familial d'IOP**

Une troisième délétion a été mise en évidence dans un cas familial d'IOP par une analyse par puce SNP. La délétion identifiée chez cette patiente était d'une taille inférieure à celle des deux premières patientes (taille minimale délétée : 83,223,425 - 84,832,932) (Figure 21). La recherche de la délétion chez la sœur présentant également une IOP et chez la mère non atteinte a montré l'absence de la délétion.

Afin d'éliminer une autre cause génétique d'IOP, 23 gènes impliqués dans l'IOP ont été séquencés chez les deux sœurs et la mère. Cette étude a montré la présence d'un polymorphisme (p.R222H) dans le gène *GPR3* (*G protein-coupled receptor 3*) et une mutation (p.L148P) dans le gène *BMP15* chez les deux sœurs mais absents chez la mère. La mutation p.L148P a déjà été rapportée dans la littérature et les études fonctionnelles montrent une altération de la fonction de la protéine responsable d'IOP chez les patientes porteuses de cette mutation.

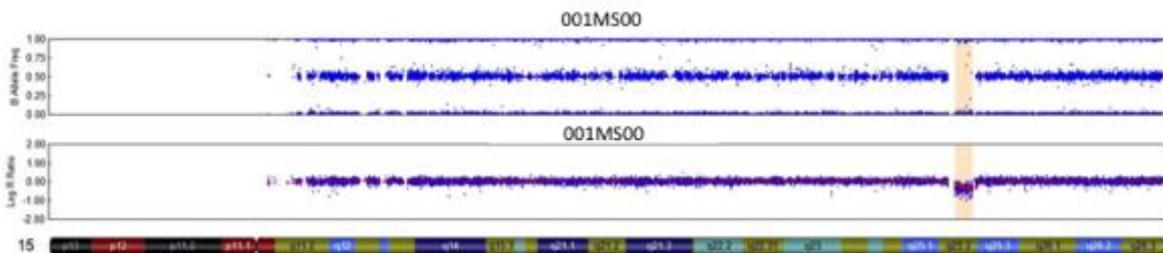


Figure 21. Résultat puce SNP patiente 3 montrant une délétion d'environ 1,6 Mb sur le chromosome 15 en 15q26.2.

## e) Discussion

Ce travail rapporte les cas de trois patientes, présentant une IOP précoce survenue vers l'âge de 20 ans ou une aménorrhée primaire, porteuses d'une microdélétion 15q25.2 contenant le gène *CPEBI*. Cette région 15q25.2 contient quatre LCRs (Low Copy Repeats). Dans le génome humain, ces LCR prédisposent à des recombinaisons homologues non alléliques (NAHR) qui peuvent être ou non responsables de syndromes reconnaissables. Dans les trois cas que nous rapportons, le point de cassure proximal des délétions est situé dans le LCR 15q25.2B et les points de cassure distaux sont situés dans le LCR 15q25.2D pour les patientes 1 et 2 et dans le LCR 15q25.2C pour la patiente 3. Par ailleurs, aucune délétion ou duplication de cette région n'est rapportée dans la base de données DGV.

Des cas de délétion 15q25.2 ont été rapportés précédemment dans la littérature. Cinq cas correspondaient à des enfants présentant des malformations congénitales et/ou des déficiences intellectuelles et qui étaient pré-pubères. Le sixième cas correspondait à une microdélétion découverte parmi 17 microduplications et sept microdélétions identifiées dans une cohorte de patiente ayant une IOP. La microdélétion identifiée en 15q25.2 avait la même taille que celle de notre patiente 3, cependant il n'y avait pas de renseignement clinique précis concernant l'âge de survenue de l'IOP (McGuire et al., 2011).

La région minimale commune chez nos trois patientes contient 26 gènes dont 12 gènes OMIM. Parmi ceux-ci, seul le gène *CPEBI* était un bon candidat car il était le seul impliqué en reproduction. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les souris *KO* pour *Cpeb* présentent un arrêt de développement des ovocytes au stade pachytène avec une absence de formation des complexes synaptonémaux entraînant une absence de follicules chez les souris femelles adultes responsable d'une infertilité (Tay and Richter, 2001). En prenant en compte ces données et le fait que les patientes ont soit une aménorrhée primaire soit une aménorrhée secondaire vers l'âge de 20 ans, on peut suggérer que l'haploinsuffisance de *CPEBI* est responsable de la survenue d'une IOP précoce chez l'humain. Ceci est renforcé par la présentation de l'IOP dans la famille de la patiente 3. En effet, la sœur qui présente également une IOP, mais de survenue beaucoup plus tardive à l'âge de 38 ans, présente une mutation dans *BMP15* mais pas de délétion de *CPEBI* tandis que la patiente 3 porteuse de la mutation dans *BMP15* et la délétion de *CPEBI* présente une aménorrhée secondaire très précoce à l'âge

de 21 ans, suggérant que l'haploinsuffisance touchant *CPEBI* pourrait être un facteur aggravant d'autres causes d'IOP.

Nos données associées à celle de McGuire suggèrent que la microdélétion comprenant *CPEBI* est impliquée dans environ 1% des IOP idiopathiques.

Ce travail a donc permis de mettre en évidence une nouvelle microdélétion associée à une IOP. Cette microdélétion reste rare mais correspond à une microdélétion récurrente puisqu'elle est médiée par des LCRs situés dans la région. Ce travail montre l'importance de l'utilisation de puces à ADN pour le diagnostic et le conseil génétique des patientes présentant une IOP.

## **2. Cohorte FAMIOP (données non publiées)**

Nous avons vu dans le paragraphe précédent qu'une délétion de *CPEBI* a été identifiée chez une patiente dont la sœur présente également une IOP. Cette délétion a été identifiée au sein d'une cohorte constituée dans le cadre d'un PHRC portant sur les formes familiales d'IOP.

### **a) Résultats de l'étude SNP**

Cette cohorte est constituée de 37 cas index (CI), de 31 apparentés atteints (AA) et de 23 apparentés non atteints (ANA). Une étude en puce SNP a pu être réalisée pour l'ensemble des cas index ainsi que des apparentés atteints.

Nous avons mis en évidence 381 CNVs au total avec une médiane de 5,5 CNVs par patientes. La taille des CNVs allait de 4,4 kb à 1,8 Mb. Sur l'ensemble de ces CNVs, six CNVs (y compris la délétion incluant le gène *CPEBI* précédemment décrite) non rapportés comme pathogène ou polymorphique dans les bases de données ont été identifiés chez des cas index (Tableau 24). Une duplication située en 17q25 d'environ 490 kb a été identifiée chez un cas index et chez l'apparenté atteint mais la taille de la duplication chez l'apparenté n'est que de 487 kb. Cette duplication contient six gènes dont un microRNA (miRNA). Aucun gène compris dans cette duplication ne semble être un gène candidat pour expliquer l'IOP.

### **Délétion 15q25**

Cette délétion contient le gène *CPEB1* et a déjà été décrite dans la partie portant sur *CPEB1*.

### **Délétion 4q35**

Une délétion d'environ 723 kb a été mise en évidence chez un cas index mais pas chez l'apparenté atteint. Aucun apparenté non atteint n'a pu être inclus dans l'étude, le caractère *de novo* ou non n'a pas pu être établi. Cette délétion contient le gène *CASP3* codant pour la caspase 3, une protéine impliquée dans l'apoptose cellulaire.

### **Autres CNV**

Les trois autres CNVs identifiés sont situés en 1q44, 4p15 et 16p13.3. Aucun gène exprimé dans la gonade ou associé au développement folliculaire n'est présent dans ces remaniements. De la même manière aucun gène appartenant aux voies de signalisation impliquées dans le développement folliculaire n'est retrouvé.

Tableau 24. CNVs n'étant pas rapportés comme pathogène ou non pathogène dans les bases de données.

Patient	Statut	Localisation	Taille	Remaniement	Gènes
001AO00	CI	1: 245 950 642 - 247 845 256	1,8 Mb	Délétion	SMYD3,CHCHD4P5,RNU6-1283P,LOC255654,TFB2M,CNST,LOC100887078,SCCPDH,RPL35AP6,LINC01341,AHCTF1,ZNF695,ZNF670-ZNF695,LOC100419806,ZNF670,LOC100420880,ZNF669,C1orf229,FGFR3P6,ZNF124,VN1R16P,LOC100131465,ZNF731P, <b>MIR3916</b> ,RNA5SP82,LOC343165,VN1R17P,VN1R5,ZNF496,NLRP3,OR2B11,OR2W5,GCSAML,GCSAML-AS1,OR2C3,OR2G2,OR2G3,OR14L1P,OR3D1P,OR13G1
008DL00	CI	4: 23 160 661 - 23 579 235	418 kb	Duplication	RFPL4AP3
001BS00	CI	4: 185 531 158 - 186 254 126	723 kb	Délétion	LVCAT8, <b>CASP3</b> ,PRIMPOL,CENPU,ACSL1,SLED1,MIR3945HG, <b>MIR3945</b> ,LINC01093, <b>MIR4455</b> ,HELT,SLC25A4,CFAP97,SNX25
001MS00	CI	15: 83 213 963 - 84 832 932	1,6 Mb	Délétion	<b>CPEB1</b> ,CPEB1-AS1,AP3B2,LOC100421235,LOC338963,ACTG1P17,SNHG21,FSD2,SCARNA15,WHAMM,HOMER2,FAM103A1
005MM00	CI	16: 5 698 006 - 6 820 960	1,1 Mb	Duplication	RBFOX1,RNU7-99P
004RM00	CI	17: 75 177 261 - 75 668 077	490 kb	Duplication	SEC14L1,CYCSP40,LOC105371907,SEPT9, <b>MIR4316</b> ,LOC100507351
004RM12	AA	17: 75 180 432 - 75 668 077	487 kb	Duplication	SEC14L1,CYCSP40,LOC105371907,SEPT9, <b>MIR4316</b> ,LOC100507351

### Régions de ROH

Plusieurs régions de ROH ont été identifiées. Les régions communes de ROH chez les CI et les AA sont rapportées dans le Tableau 25. Aucun gène d'intérêt n'a été mis en évidence dans les régions communes de ROH chez les cas index et les apparentés.

Tableau 25. Régions communes de ROH chez les patients et les apparentés.

Patient	Nbe de ROH	Taille (Mb)	Min-Max	Coef de consanguinité	Gènes	OMIM	Nbe de régions communes	Régions communes	Nbe de gènes région commune	Dont OMIM	Gènes d'intérêt	Taille régions communes
25001AO11	28	101	1-14,2	1/16	1953	864	7	chr3:82024432-87101747, chr4:8729137-9916180, chr6:62675670-63893492, chr6:27098027-28984512, chr17:9714086-13678172, chr17:54179382-63429977, chr17:39902271-54158115	773	327	-	37 Mb
25001AO00	27	90	1-16,5	1/16	1479	595						
01001ER12	21	45	1-10,3	1/32	774	274	1	chr5:44632008-45840303	4		-	1,2
01001ER13	13	38	1-12,6	1/32	611	216						
01001ER00	22	56	1-12,6	1/32	846	326						
01011RE00	25	137	1-23,9	3/32	1723	494	8	chr8:50044748-51949268, chr10:36862892-38364693, chr10:75411198-75702131, chr11:3488541-6011761, chr11:30780931-31793051, chr11:48234357-49960141, chr12:65400603-89376538, chr19:36651499-38472344	492	121	-	35
01011RE12	27	114	1-37,7	3/32	1778	575						
05001BS00	36	183	1-29,9	1/8	1971	690	1	chr12:88362392-89462206	10	2	-	1
05001BS11	24	45	1-5,5	1/32	705	265						

*Résultats - Discussion*

Patient	Nbe de ROH	Taille (Mb)	Min-Max	Coef de consanguinité	Gènes	OMIM	Nbe de régions communes	Régions communes	Nbe de gènes région commune	Dont OMIM	Gènes d'intérêt	Taille régions communes
07003ZJ00	34	127	1-14	3/32	1940	718	7	chr1:106394002-113391029, chr2:31271882-31527853, chr2:87091247-88371441, chr5:100132083-101191593, chr8:50279613-51328497, chr12:20961322-21991620, chr20:25260931-26293985	214	88	-	13
07003ZJ11	28	120	1-19,9	3/32	1636	610						

**b) Discussion**

L'analyse par puce SNP dans la cohorte FAMIOP de patientes présentant une IOP familiale, a mis en évidence deux CNVs contenant chacun un gène d'intérêt. Le premier CNV concerne la région 15q25.2 et le gène *CPEBI* déjà rapporté dans la partie précédente. Le deuxième CNV situé en 4q35 contient le gène *CASP3*. Cette délétion n'est retrouvée que chez le cas index. Cependant nous avons vu précédemment avec l'exemple de *CPEBI* qu'il pouvait y avoir différents facteurs impliqués dans la survenue d'une IOP au sein d'une même famille.

Le gène *CASP3* code pour la protéine Caspase 3. Nous avons vu que la voie des Caspases est impliquée dans la régulation du pool de follicule primordiaux et en particulier la Caspase 3. En 2001, Matikainen et al. ont étudié *in vivo* et *in vitro* les effets de l'absence d'expression de *Casp3* chez la souris. L'étude histologique des ovaires chez des souriceaux âgés de 4 jours ne montre pas de différence dans l'architecture des gonades et la quantité de follicules primordiaux, primaire et pré-antraux non atrétiques entre les souris *WT* et les souris *Casp<sup>-/-</sup>*. En revanche, l'étude de la structure des follicules montre la présence de follicules atrétiques anormaux ayant une taille réduite ou totalement désorganisés avec la présence ou parfois d'un infiltrat de cellules sanguines. Par ailleurs, les ovocytes sont également anormaux. Certains ovocytes sont activés présentant une reprise de méiose tandis que d'autres ovocytes ont dégénéré (Matikainen et al., 2001). *CASP3* semble être nécessaire à la régulation du pool de follicules primordiaux mais joue également un rôle dans le développement et l'atrésie des follicules chez les souris adultes.

Une délétion beaucoup plus grande de 7,18 Mb comprenant 64 gènes dont le gène *CASP3* est rapporté dans la base de données DECIPHER chez une patiente présentant de multiples anomalies et malformations et en particulier une aplasie ovarienne. Concernant les autres cas de délétion comprenant *CASP3*, aucun renseignement sur le phénotype gonadique des patients n'est rapporté. Par ailleurs, le score d'haploinsuffisance rapporté dans DECIPHER pour le gène *CASP3* est de 0,24% correspondant à un score très élevé indiquant que l'haploinsuffisance de *CASP3* est potentiellement délétère. Des mutations somatiques de *CASP3* sont rapportées dans différents types de cancer mais aucune mutation constitutionnelle n'a été rapportée jusqu'à maintenant (Soung et al., 2004). L'ensemble de ces données font de *CASP3* un bon gène candidat pour la survenue d'une IOP. Cependant afin de confirmer ce résultat, des études complémentaires seront à réaliser.

Les autres CNVs identifiés ne contiennent pas de gènes d'intérêt. En revanche, quatre d'entre eux contiennent des miRNA. Les miRNA correspondent à des petits ARN non codants d'environ 19 à 24 nucléotides qui jouent un rôle important dans l'expression des gènes (Bartel, 2004). Ils régulent la traduction et l'expression des gènes en se fixant sur une séquence spécifique de la région 3'UTR de l'ARNm cible conduisant au clivage de l'ARNm et donc à la répression de l'expression du gène (Virant-Klun et al., 2016). Un miRNA peut cibler plusieurs ARNm et un ARNm peut être régulé par plusieurs miRNA. De nombreuses études se sont intéressées à l'expression de ces miRNA dans l'ovaire et le testicule. Ces études ont montré une expression préférentielle ou exclusive de quelques miRNA dans les ovaires de différentes espèces : let-7 family, miR-21, miR-99a, miR-125b, miR-126, miR-143, miR-145, et miR-199b. Ils ont également montré qu'il existait un biais d'expression entre la gonade masculine et la gonade féminine indiquant un rôle spécifique de ces miRNA dans chaque gonade (Hossain et al., 2012). Aucun des miRNA identifié chez nos patients n'appartient à ces familles de miRNA. Il est donc difficile de conclure que ces miRNA jouent un rôle dans la survenue de l'IOP chez nos patientes.

Au total cette étude n'a pas mis en évidence de gènes responsable de forme familiale d'IOP. En revanche, nous avons identifié *CASP3* comme gène candidat responsable d'IOP. Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires pour confirmer son implication.

## Conclusion

Le sujet de cette thèse était d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le développement et le fonctionnement de la gonade masculine et féminine en partant de l'étude d'une population de patient ayant un DSD 46,XX avec un développement testiculaire ou ovotesticulaire et d'une population de patientes ayant une insuffisance ovarienne prématurée.

Nous avons mis en évidence par une analyse en puce SNP des micro-remaniements chromosomiques dans une région située en amont de *SOX9*, dans un désert génique. Ceci nous a permis de redéfinir la région minimale critique impliquée dans l'activation de l'expression de *SOX9* en l'absence de *SRY*. Une étude portant sur un plus grand nombre de patient a permis de montrer que le remaniement de cette région était probablement impliqué dans le développement testiculaire chez environ 10% des patients ayant un caryotype 46,XX, *SRY* négatif.

De manière intéressante, l'analyse de l'exome chez les patients ayant une étude en puce SNP normale a permis de mettre en évidence la présence de séquences du chromosome Y chez un patient grâce aux techniques de NGS. Ceci suggère que certains cas de DSD 46,XX avec développement testiculaire pourraient être expliqué par la présence d'une chimère 46,XX/46,XY avec une lignée XY minoritaire présente au niveau des gonades permettant le développement testiculaire. Cette étude a également permis de mettre en évidence un variant homozygote dans le gène *LGR5* qui appartient à la voie de régulation WNT/ $\beta$ -caténine mais des études complémentaires sont nécessaire pour impliquer ce gène dans la survenue d'un DSD. L'étude des autres patients n'a pas permis d'identifier de nouveaux gènes candidats qui pourraient jouer un rôle dans le développement gonadique.

L'association des résultats des données de puces et d'exomes laisse penser que les études génétiques dans le cadre des DSD, dans l'avenir, ne devront plus seulement s'intéresser aux régions codantes. Des études génomes entiers permettront peut-être de mettre en évidence des mutations ou des remaniements dans des régions régulatrices comme c'est le cas pour la région *RevSex* en amont de *SOX9*. Concernant cette région, nous avons proposé un mécanisme permettant d'expliquer le rôle de ce microremaniement dans l'activation de *SOX9* mais des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer le mécanisme exact. La difficulté actuelle pour répondre à ce problème réside dans le fait qu'il est impossible d'avoir

accès à la gonade au moment de son développement. C'est pourquoi, l'utilisation de cellules IPS de patients ayant un remaniement de cette région, associée à des techniques de capture de conformation chromatinienne pourrait peut-être permettre de répondre en partie à cette question.

L'étude en puce SNP dans la cohorte de patiente présentant une IOP nous a permis d'identifier une nouvelle microdélétion récurrente contenant le gène *CPEB1* suggérant le rôle de l'haploinsuffisance de celui-ci dans la survenue d'une IOP précoce. L'étude de la séquence du gène n'a pas permis de mettre en évidence de mutation, cependant le modèle de souris *KO* présente un phénotype strictement identique et il existe d'autres exemples de pathologie où c'est la délétion du gène et donc son haploinsuffisance qui est responsable d'un phénotype anormal. Cette délétion du gène *CPEB1* permet d'expliquer environ 1% des cas d'IOP idiopathiques. Ceci en fait une cause rare mais récurrente d'IOP.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence une délétion du gène *CASP3* qui est un bon candidat pour la survenue d'une IOP, les souris *KO* ayant un phénotype tout à fait comparable à celui retrouvé chez l'humain. Cependant afin de confirmer l'implication de *CASP3* dans la survenue d'une IOP, l'étude de la cohorte par séquençage du gène pourrait être réalisée pour rechercher des mutations qui altéreraient la fonction de la protéine.

Ce travail confirme l'intérêt de l'étude par puce SNP pour le diagnostic et la prise en charge des patients présentant une IOP.

## Bibliographie

- Accili, D., and Arden, K.C. (2004). FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 117, 421–426.
- Allard, S., Adin, P., Gouédard, L., di Clemente, N., Josso, N., Orgebin-Crist, M.C., Picard, J.Y., and Xavier, F. (2000). Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of beta-catenin. *Dev. Camb. Engl.* 127, 3349–3360.
- Allingham-Hawkins, D.J., Babul-Hirji, R., Chitayat, D., Holden, J.J., Yang, K.T., Lee, C., Hudson, R., Gorwill, H., Nolin, S.L., Glicksman, A., et al. (1999). Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. *Am. J. Med. Genet.* 83, 322–325.
- Andersson, S., Berman, D.M., Jenkins, E.P., and Russell, D.W. (1991). Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 354, 159–161.
- Arango, N.A., Lovell-Badge, R., and Behringer, R.R. (1999). Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 99, 409–419.
- Arden, K.C., and Biggs, W.H. (2002). Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* 403, 292–298.
- Bagheri-Fam, S., Barrionuevo, F., Dohrmann, U., Günther, T., Schüle, R., Kemler, R., Mallo, M., Kanzler, B., and Scherer, G. (2006). Long-range upstream and downstream enhancers control distinct subsets of the complex spatiotemporal *Sox9* expression pattern. *Dev. Biol.* 291, 382–397.
- Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S., Floridia, G., Worley, K.C., Tonini, G., Ferrante, E., Chiumello, G., McCabe, E.R., and Fraccaro, M. (1994). A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat. Genet.* 7, 497–501.
- Barrionuevo, F., Georg, I., Scherthan, H., Lécureuil, C., Guillou, F., Wegner, M., and Scherer, G. (2009). Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of *Sox9* but fails in the combined absence of *Sox9* and *Sox8*. *Dev. Biol.* 327, 301–312.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Bashamboo, A., Brauner, R., Bignon-Topalovic, J., Lortat-Jacob, S., Karageorgou, V., Lourenco, D., Guffanti, A., and McElreavey, K. (2014). Mutations in the *FOG2/ZFPM2* gene are associated with anomalies of human testis determination. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3657–3665.
- Baxter, R.M., Arboleda, V.A., Lee, H., Barseghyan, H., Adam, M.P., Fechner, P.Y., Bargman, R., Keegan, C., Travers, S., Schelley, S., et al. (2015). Exome sequencing for the diagnosis of 46,XY disorders of sex development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, E333–344.
- Beau, I., Touraine, P., Meduri, G., Gougeon, A., Desroches, A., Matuchansky, C., Milgrom, E., Kuttann, F., and Misrahi, M. (1998). A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *J. Clin. Invest.* 102,

- 1352–1359.
- Bell, R., Murday, V.A., Patton, M.A., and Jeffery, S. (2001). Two families with blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome have mutations in the putative forkhead transcription factor FOXL2. *Genet. Test.* 5, 335–338.
- Benko, S., Fantes, J.A., Amiel, J., Kleinjan, D.-J., Thomas, S., Ramsay, J., Jamshidi, N., Essafi, A., Heaney, S., Gordon, C.T., et al. (2009). Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. *Nat. Genet.* 41, 359–364.
- Benko, S., Gordon, C.T., Mallet, D., Sreenivasan, R., Thauvin-Robinet, C., Brendehaug, A., Thomas, S., Bruland, O., David, M., Nicolino, M., et al. (2011). Disruption of a long distance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex development. *J. Med. Genet.* 48, 825–830.
- Bernard, P., Ryan, J., Sim, H., Czech, D.P., Sinclair, A.H., Koopman, P., and Harley, V.R. (2012). Wnt signaling in ovarian development inhibits Sf1 activation of Sox9 via the Tesco enhancer. *Endocrinology* 153, 901–912.
- Biason-Lauber, A. (2012). WNT4, RSPO1, and FOXL2 in sex development. *Semin. Reprod. Med.* 30, 387–395.
- Biason-Lauber, A., Konrad, D., Meyer, M., DeBeaufort, C., and Schoenle, E.J. (2009). Ovaries and female phenotype in a girl with 46,XY karyotype and mutations in the CBX2 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 658–663.
- Bione, S., Sala, C., Manzini, C., Arrigo, G., Zuffardi, O., Banfi, S., Borsani, G., Jonveaux, P., Philippe, C., Zuccotti, M., et al. (1998). A human homologue of the *Drosophila melanogaster* diaphanous gene is disrupted in a patient with premature ovarian failure: evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 533–541.
- Bitgood, M.J., Shen, L., and McMahon, A.P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr. Biol.* CB 6, 298–304.
- Bogani, D., Siggers, P., Brixey, R., Warr, N., Beddow, S., Edwards, J., Williams, D., Wilhelm, D., Koopman, P., Flavell, R.A., et al. (2009). Loss of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 4 (MAP3K4) Reveals a Requirement for MAPK Signalling in Mouse Sex Determination. *PLoS Biol.* 7, e1000196.
- Bor, Y., Swartz, J., Morrison, A., Rekosh, D., Lodomery, M., and Hammarskjöld, M.-L. (2006). The Wilms' tumor 1 (WT1) gene (+KTS isoform) functions with a CTE to enhance translation from an unspliced RNA with a retained intron. *Genes Dev.* 20, 1597–1608.
- Bouilly, J., Veitia, R.A., and Binart, N. (2014). NOBOX is a key FOXL2 partner involved in ovarian folliculogenesis. *J. Mol. Cell Biol.* 6, 175–177.
- Bouilly, J., Roucher-Boulez, F., Gompel, A., Bry-Gauillard, H., Azibi, K., Beldjord, C., Dodé, C., Bouligand, J., Mantel, A.G., Hécart, A.-C., et al. (2015). New NOBOX mutations identified in a large cohort of women with primary ovarian insufficiency decrease KIT-L expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 994–1001.
- Boulanger, L., Pannetier, M., Gall, L., Allais-Bonnet, A., Elzaiat, M., Le Bourhis, D., Daniel, N., Richard, C., Cotinot, C., Ghyselinck, N.B., et al. (2014). FOXL2 Is a Female Sex-Determining Gene in the Goat. *Curr. Biol.* 24, 404–408.

- Bowles, J., Schepers, G., and Koopman, P. (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* 227, 239–255.
- Bromilow, I.M., and Duguid, J. (1989). The Liverpool chimaera. *Vox Sang.* 57, 147–149.
- Bulun, S.E. (1996). Clinical review 78: Aromatase deficiency in women and men: would you have predicted the phenotypes? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 867–871.
- Calderon, F.R.O., Phansalkar, A.R., Crockett, D.K., Miller, M., and Mao, R. (2007). Mutation database for the galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) gene. *Hum. Mutat.* 28, 939–943.
- Call, K.M., Glaser, T., Ito, C.Y., Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber, D.A., Rose, E.A., Kral, A., Yeager, H., Lewis, W.H., et al. (1990). Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60, 509–520.
- Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655–1657.
- Canto, P., Söderlund, D., Reyes, E., and Méndez, J.P. (2004). Mutations in the desert hedgehog (DHH) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 4480–4483.
- Canto, P., Vilchis, F., Söderlund, D., Reyes, E., and Méndez, J.P. (2005). A heterozygous mutation in the desert hedgehog gene in patients with mixed gonadal dysgenesis. *Mol. Hum. Reprod.* 11, 833–836.
- Carmon, K.S., Lin, Q., Gong, X., Thomas, A., and Liu, Q. (2012). LGR5 Interacts and Cointernalizes with Wnt Receptors To Modulate Wnt/ -Catenin Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2054–2064.
- Castrillon, D.H. (2003). Suppression of Ovarian Follicle Activation in Mice by the Transcription Factor Foxo3a. *Science* 301, 215–218.
- Castro, J.J., Méndez, J.P., Coral-Vázquez, R.M., Soriano-Ursúa, M.A., Damian-Matsumura, P., Benítez-Granados, J., Rosas-Vargas, H., and Canto, P. (2013). In vitro and molecular modeling analysis of two mutant desert hedgehog proteins associated with 46,XY gonadal dysgenesis. *DNA Cell Biol.* 32, 524–530.
- Chaboissier, M.-C., Kobayashi, A., Vidal, V.I.P., Lützkendorf, S., van de Kant, H.J.G., Wegner, M., de Rooij, D.G., Behringer, R.R., and Schedl, A. (2004). Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* 131, 1891–1901.
- Chassot, A.-A., Ranc, F., Gregoire, E.P., Roepers-Gajadien, H.L., Taketo, M.M., Camerino, G., de Rooij, D.G., Schedl, A., and Chaboissier, M.-C. (2008a). Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1264–1277.
- Chassot, A.A., Gregoire, E.P., Magliano, M., Lavery, R., and Chaboissier, M.C. (2008b). Genetics of ovarian differentiation: Rspo1, a major player. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* 2, 219–227.
- Chassot, A.-A., Gregoire, E.P., Lavery, R., Taketo, M.M., de Rooij, D.G., Adams, I.R., and Chaboissier, M.-C. (2011). RSP01/ $\beta$ -catenin signaling pathway regulates oogonia differentiation and entry into meiosis in the mouse fetal ovary. *PLoS One* 6, e25641.

- Chassot, A.-A., Bradford, S.T., Auguste, A., Gregoire, E.P., Pailhoux, E., de Rooij, D.G., Schedl, A., and Chaboissier, M.-C. (2012). WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 4461–4472.
- Chiang, H.-S., Wu, Y.-N., Wu, C.-C., and Hwang, J.-L. (2013). Cytogenic and molecular analyses of 46,XX male syndrome with clinical comparison to other groups with testicular azoospermia of genetic origin. *J. Formos. Med. Assoc. Taiwan Yi Zhi* *112*, 72–78.
- Childs, A.J., Cowan, G., Kinnell, H.L., Anderson, R.A., and Saunders, P.T.K. (2011). Retinoic Acid signalling and the control of meiotic entry in the human fetal gonad. *PLoS One* *6*, e20249.
- Choi, Y., and Rajkovic, A. (2006). Characterization of NOBOX DNA binding specificity and its regulation of Gdf9 and Pou5f1 promoters. *J. Biol. Chem.* *281*, 35747–35756.
- Choi, Y., Yuan, D., and Rajkovic, A. (2008a). Germ Cell-Specific Transcriptional Regulator *Sohlh2* Is Essential for Early Mouse Folliculogenesis and Oocyte-Specific Gene Expression. *Biol. Reprod.* *79*, 1176–1182.
- Choi, Y., Ballow, D.J., Xin, Y., and Rajkovic, A. (2008b). Lim Homeobox Gene, *Lhx8*, Is Essential for Mouse Oocyte Differentiation and Survival. *Biol. Reprod.* *79*, 442–449.
- Christin-Maitre, S., Pasquier, M., Donadille, B., and Bouchard, P. (2006). [Premature ovarian failure]. *Ann. Endocrinol.* *67*, 557–566.
- Clark, A.M., Garland, K.K., and Russell, L.D. (2000). Desert hedgehog (*Dhh*) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol. Reprod.* *63*, 1825–1838.
- Cory, A.T., Boyer, A., Pilon, N., Lussier, J.G., and Silversides, D.W. (2007). Presumptive pre-Sertoli cells express genes involved in cell proliferation and cell signalling during a critical window in early testis differentiation. *Mol. Reprod. Dev.* *74*, 1491–1504.
- Cox, J.J., Willatt, L., Homfray, T., and Woods, C.G. (2011). A SOX9 duplication and familial 46,XX developmental testicular disorder. *N. Engl. J. Med.* *364*, 91–93.
- Cox, K., Bryce, J., Jiang, J., Rodie, M., Sinnott, R., Alkhawari, M., Arlt, W., Audi, L., Balsamo, A., Bertelloni, S., et al. (2014). Novel Associations in Disorders of Sex Development: Findings From the I-DSD Registry. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *99*, E348–E355.
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., et al. (2001). The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat. Genet.* *27*, 159–166.
- De Baere, E. (2001). Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype-phenotype correlation. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 1591–1600.
- De Baere, E., Lemercier, B., Christin-Maitre, S., Durval, D., Messiaen, L., Fellous, M., and Veitia, R. (2002). FOXL2 mutation screening in a large panel of POF patients and XX males. *J. Med. Genet.* *39*, e43.
- De Felici, M. (2013). Origin, Migration, and Proliferation of Human Primordial Germ Cells.

- In Oogenesis, G. Coticchio, D.F. Albertini, and L. De Santis, eds. (London: Springer London), pp. 19–37.
- De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F., and Berta, P. (1998). Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 6653–6665.
- De Santa Barbara, P., Moniot, B., Poulat, F., and Berta, P. (2000). Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev. Dyn.* *217*, 293–298.
- De Vos, M., Devroey, P., and Fauser, B.C.J.M. (2010). Primary ovarian insufficiency. *Lancet* *376*, 911–921.
- DeFalco, T., Takahashi, S., and Capel, B. (2011). Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Dev. Biol.* *352*, 14–26.
- Desimio, M., Campolo, F., Dolci, S., De Felici, M., and Farini, D. (2015). SOHLH1 and SOHLH2 directly down-regulate STIMULATED BY RETINOIC ACID 8 (STRA8) expression. *Cell Cycle* *14*, 1036–1045.
- Di Pasquale, E., Rossetti, R., Marozzi, A., Bodega, B., Borgato, S., Cavallo, L., Einaudi, S., Radetti, G., Russo, G., Sacco, M., et al. (2006). Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *91*, 1976–1979.
- Dong, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N., and Matzuk, M.M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* *383*, 531–535.
- Dube, J.L., Wang, P., Elvin, J., Lyons, K.M., Celeste, A.J., and Matzuk, M.M. (1998). The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *12*, 1809–1817.
- Duffin, K., Bayne, R.A.L., Childs, A.J., Collins, C., and Anderson, R.A. (2009). The forkhead transcription factor FOXL2 is expressed in somatic cells of the human ovary prior to follicle formation. *Mol. Hum. Reprod.* *15*, 771–777.
- Edson, M.A., Nagaraja, A.K., and Matzuk, M.M. (2009). The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocr. Rev.* *30*, 624–712.
- Eggers, S., and Sinclair, A. (2012). Mammalian sex determination-insights from humans and mice. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.*
- Eissenberg, J.C., and Shilatifard, A. (2010). Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Dev. Biol.* *339*, 240–249.
- El-Khairi, R., and Achermann, J.C. (2012). Steroidogenic factor-1 and human disease. *Semin. Reprod. Med.* *30*, 374–381.
- Encha-Razavi, F., and Escudier, E. (2008). *Embryologie humaine : de la molécule à la clinique* (Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson).
- Falender, A.E., Lanz, R., Malenfant, D., Belanger, L., and Richards, J.S. (2003). Differential expression of steroidogenic factor-1 and FTF/LRH-1 in the rodent ovary. *Endocrinology* *144*, 3598–3610.
- Ferder, I., Parborell, F., Sundblad, V., Chiauuzzi, V., Gómez, K., Charreau, E.H., Tesone, M.,

- and Dain, L. (2013). Expression of fragile X mental retardation protein and Fmr1 mRNA during folliculogenesis in the rat. *Reprod. Camb. Engl.* *145*, 335–343.
- Foster, J.W., Dominguez-Steglich, M.A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P.A., Stevanović, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I.D., and Goodfellow, P.N. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* *372*, 525–530.
- Fowler, P.A., Flannigan, S., Mathers, A., Gillanders, K., Lea, R.G., Wood, M.J., Maheshwari, A., Bhattacharya, S., Collie-Duguid, E.S.R., Baker, P.J., et al. (2009). Gene Expression Analysis of Human Fetal Ovarian Primordial Follicle Formation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 1427–1435.
- Freiberg, A.S., Blumberg, B., Lawce, H., and Mann, J. (1988). XX/XY chimerism encountered during prenatal diagnosis. *Prenat. Diagn.* *8*, 423–426.
- Fujimoto, Y., Tanaka, S.S., Yamaguchi, Y.L., Kobayashi, H., Kuroki, S., Tachibana, M., Shinomura, M., Kanai, Y., Morohashi, K.-I., Kawakami, K., et al. (2013). Homeoproteins six1 and six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development. *Dev. Cell* *26*, 416–430.
- Furumatsu, T., Ozaki, T., and Asahara, H. (2009). Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1198–1204.
- Georg, I., Bagheri-Fam, S., Knowler, K.C., Wieacker, P., Scherer, G., and Harley, V.R. (2010). Mutations of the SRY-responsive enhancer of SOX9 are uncommon in XY gonadal dysgenesis. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.* *4*, 321–325.
- Graves, J.A. (1998). Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes. *J. Exp. Zool.* *281*, 472–481.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* *346*, 245–250.
- Guigon, C.J., and Magre, S. (2006). Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biol. Reprod.* *74*, 450–458.
- Guigon, C.J., Coudouel, N., Mazaud-Guittot, S., Forest, M.G., and Magre, S. (2005). Follicular cells acquire sertoli cell characteristics after oocyte loss. *Endocrinology* *146*, 2992–3004.
- Hadjiathanasiou, C.G., Brauner, R., Lortat-Jacob, S., Nivot, S., Jaubert, F., Fellous, M., Nihoul-Fékété, C., and Rappaport, R. (1994). True hermaphroditism: genetic variants and clinical management. *J. Pediatr.* *125*, 738–744.
- Hagerman, R.J., and Hagerman, P.J. (2002). The fragile X premutation: into the phenotypic fold. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *12*, 278–283.
- Hammes, A., Guo, J.K., Lutsch, G., Leheste, J.R., Landrock, D., Ziegler, U., Gubler, M.C., and Schedl, A. (2001). Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* *106*, 319–329.
- Hanley, N.A., Hagan, D.M., Clement-Jones, M., Ball, S.G., Strachan, T., Salas-Cortés, L.,

- McElreavey, K., Lindsay, S., Robson, S., Bullen, P., et al. (2000). SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech. Dev.* *91*, 403–407.
- Harada, N., Ogawa, H., Shozu, M., Yamada, K., Suhara, K., Nishida, E., and Takagi, Y. (1992). Biochemical and molecular genetic analyses on placental aromatase (P-450AROM) deficiency. *J. Biol. Chem.* *267*, 4781–4785.
- Harris, S.E., Chand, A.L., Winship, I.M., Gersak, K., Aittomäki, K., and Shelling, A.N. (2002). Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol. Hum. Reprod.* *8*, 729–733.
- Hawkins, J.R., Taylor, A., Goodfellow, P.N., Migeon, C.J., Smith, K.D., and Berkovitz, G.D. (1992). Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am. J. Hum. Genet.* *51*, 979–984.
- Hermey, G., Methner, A., Schaller, H.C., and Hermans-Borgmeyer, I. (1999). Identification of a novel seven-transmembrane receptor with homology to glycoprotein receptors and its expression in the adult and developing mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *254*, 273–279.
- Hoffman, G.E., Le, W.W., Entezam, A., Otsuka, N., Tong, Z.-B., Nelson, L., Flaws, J.A., McDonald, J.H., Jafar, S., and Usdin, K. (2012). Ovarian Abnormalities in a Mouse Model of Fragile X Primary Ovarian Insufficiency. *J. Histochem. Cytochem.* *60*, 439–456.
- Hossain, A., and Saunders, G.F. (2001). The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J. Biol. Chem.* *276*, 16817–16823.
- Hossain, M.M., Sohel, M.M.H., Schellander, K., and Tesfaye, D. (2012). Characterization and importance of microRNAs in mammalian gonadal functions. *Cell Tissue Res.* *349*, 679–690.
- Hu, Y.-C., Okumura, L.M., and Page, D.C. (2013). Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice. *PLoS Genet.* *9*, e1003629.
- Hughes, I.A., Houk, C., Ahmed, S.F., and Lee, P.A. (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *J. Pediatr. Urol.* *2*, 148–162.
- Ikeda, Y., Swain, A., Weber, T.J., Hentges, K.E., Zanaria, E., Lalli, E., Tamai, K.T., Sassone-Corsi, P., Lovell-Badge, R., Camerino, G., et al. (1996). Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *10*, 1261–1272.
- Ito, M., Yu, R.N., and Jameson, J.L. (1998). Steroidogenic factor-1 contains a carboxy-terminal transcriptional activation domain that interacts with steroid receptor coactivator-1. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *12*, 290–301.
- Jääskeläinen, M., Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Naillat, F., Parviainen, H., Anttonen, M., Heikinheimo, M., Liakka, A., Ola, R., Vainio, S., and Vaskivuo, T.E. (2010). WNT4 is expressed in human fetal and adult ovaries and its signaling contributes to ovarian cell survival. *Mol. Cell. Endocrinol.* *317*, 106–111.
- Janse, F., de With, L.M., Duran, K.J., Kloosterman, W.P., Goverde, A.J., Lambalk, C.B., Laven, J.S.E., Fauser, B.C.J.M., and Giltay, J.C. (2012). Limited contribution of NR5A1 (SF-1) mutations in women with primary ovarian insufficiency (POI). *Fertil. Steril.* *97*, 141–146.e2.

- Jones, R.L., and Pepling, M.E. (2013). KIT signaling regulates primordial follicle formation in the neonatal mouse ovary. *Dev. Biol.* 382, 186–197.
- Jordan, B.K., Mohammed, M., Ching, S.T., Délot, E., Chen, X.N., Dewing, P., Swain, A., Rao, P.N., Elejalde, B.R., and Vilain, E. (2001). Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1102–1109.
- Karl, J., and Capel, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev. Biol.* 203, 323–333.
- Kashimada, K., Pelosi, E., Chen, H., Schlessinger, D., Wilhelm, D., and Koopman, P. (2011). FOXL2 and BMP2 Act Cooperatively to Regulate *Follistatin* Gene Expression during Ovarian Development. *Endocrinology* 152, 272–280.
- Katoh-Fukui, Y., Tsuchiya, R., Shiroishi, T., Nakahara, Y., Hashimoto, N., Noguchi, K., and Higashinakagawa, T. (1998). Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature* 393, 688–692.
- Katoh-Fukui, Y., Miyabayashi, K., Komatsu, T., Owaki, A., Baba, T., Shima, Y., Kidokoro, T., Kanai, Y., Schedl, A., Wilhelm, D., et al. (2012). *Cbx2*, a polycomb group gene, is required for *Sry* gene expression in mice. *Endocrinology* 153, 913–924.
- Kazanskaya, O., Glinka, A., del Barco Barrantes, I., Stanek, P., Niehrs, C., and Wu, W. (2004). R-Spondin2 Is a Secreted Activator of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Is Required for *Xenopus* Myogenesis. *Dev. Cell* 7, 525–534.
- Kidokoro, T., Matoba, S., Hiramatsu, R., Fujisawa, M., Kanai-Azuma, M., Taya, C., Kurohmaru, M., Kawakami, H., Hayashi, Y., Kanai, Y., et al. (2005). Influence on spatiotemporal patterns of a male-specific *Sox9* activation by ectopic *Sry* expression during early phases of testis differentiation in mice. *Dev. Biol.* 278, 511–525.
- 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, Y., Bingham, N., Sekido, R., Parker, K.L., Lovell-Badge, R., and Capel, B. (2007). Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16558–16563.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351, 117–121.
- Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., and Jaenisch, R. (1993). *WT-1* is required for early kidney development. *Cell* 74, 679–691.
- Kumar, K.K., Burgess, A.W., and Gulbis, J.M. (2014). Structure and function of LGR5: An enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells: A Review of LGR5 Structure and Function. *Protein Sci.* 23, 551–565.
- Kumar, T.R., Wang, Y., Lu, N., and Matzuk, M.M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat. Genet.* 15, 201–204.
- Kuroki, S., Matoba, S., Akiyoshi, M., Matsumura, Y., Miyachi, H., Mise, N., Abe, K., Ogura, A., Wilhelm, D., Koopman, P., et al. (2013). Epigenetic Regulation of Mouse Sex Determination by the Histone Demethylase *Jmjd1a*. *Science* 341, 1106–1109.
- Kusaka, M., Katoh-Fukui, Y., Ogawa, H., Miyabayashi, K., Baba, T., Shima, Y., Sugiyama, N., Sugimoto, Y., Okuno, Y., Kodama, R., et al. (2010). Abnormal Epithelial Cell

- Polarity and Ectopic Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression Induced in Emx2 KO Embryonic Gonads. *Endocrinology* 151, 5893–5904.
- Lacombe, A., Lee, H., Zahed, L., Choucair, M., Muller, J.-M., Nelson, S.F., Salameh, W., and Vilain, E. (2006). Disruption of POF1B binding to nonmuscle actin filaments is associated with premature ovarian failure. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 113–119.
- Laiusue, P., Christin-Maitre, S., Touraine, P., Kuttann, F., Ritvos, O., Aittomaki, K., Bourcigaux, N., Jacquesson, L., Bouchard, P., Frydman, R., et al. (2006). Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 154, 739–744.
- Laitinen, M., Vuojolainen, K., Jaatinen, R., Ketola, I., Aaltonen, J., Lehtonen, E., Heikinheimo, M., and Ritvos, O. (1998). A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech. Dev.* 78, 135–140.
- Lambeth, L.S., Raymond, C.S., Roeszler, K.N., Kuroiwa, A., Nakata, T., Zarkower, D., and Smith, C.A. (2014). Over-expression of DMRT1 induces the male pathway in embryonic chicken gonads. *Dev. Biol.* 389, 160–172.
- Lavery, R., Chassot, A.-A., Pauper, E., Gregoire, E.P., Klopfenstein, M., de Rooij, D.G., Mark, M., Schedl, A., Ghyselinck, N.B., and Chaboissier, M.-C. (2012). Testicular differentiation occurs in absence of R-spondin1 and Sox9 in mouse sex reversals. *PLoS Genet.* 8, e1003170.
- Lechowska, A., Bilinski, S., Choi, Y., Shin, Y., Kloc, M., and Rajkovic, A. (2011). Premature ovarian failure in nobox-deficient mice is caused by defects in somatic cell invasion and germ cell cyst breakdown. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28, 583–589.
- Lin, Y.-T., and Capel, B. (2015). Cell fate commitment during mammalian sex determination. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 32, 144–152.
- Liu, G. (2000). Galactose metabolism and ovarian toxicity. *Reprod. Toxicol.* 14, 377–384.
- Liu, L., Rajareddy, S., Reddy, P., Du, C., Jagarlamudi, K., Shen, Y., Gunnarsson, D., Selstam, G., Boman, K., and Liu, K. (2007). Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Development* 134, 199–209.
- Lourenço, D., Brauner, R., Lin, L., De Perdigo, A., Weryha, G., Muresan, M., Boudjenah, R., Guerra-Junior, G., Maciel-Guerra, A.T., Achermann, J.C., et al. (2009). Mutations in *NR5A1* Associated with Ovarian Insufficiency. *N. Engl. J. Med.* 360, 1200–1210.
- Lucas-Herald, A.K., and Bashamboo, A. (2014). Gonadal Development. In *Endocrine Development*, O. Hiort, and S.F. Ahmed, eds. (Basel: S. KARGER AG), pp. 1–16.
- Ludbrook, L., and Harley, V. (2004). Sex determination: a “window” of DAX1 activity. *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 116–121.
- Ludbrook, L.M., Bernard, P., Bagheri-Fam, S., Ryan, J., Sekido, R., Wilhelm, D., Lovell-Badge, R., and Harley, V.R. (2012). Excess DAX1 leads to XY ovotesticular disorder of sex development (DSD) in mice by inhibiting steroidogenic factor-1 (SF1) activation of the testis enhancer of SRY-box-9 (Sox9). *Endocrinology* 153, 1948–1958.
- Luo, X., Ikeda, Y., and Parker, K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for

- adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481–490.
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P.M., Birchmeier, W., et al. (2002). Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1184–1193.
- 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, 2949–2955.
- Malan, V., Vekemans, M., and Turleau, C. (2006). Chimera and other fertilization errors. *Clin. Genet.* 70, 363–373.
- Malan, V., Gesny, R., Morichon-Delvallez, N., Aubry, M.C., Benachi, A., Sanlaville, D., Turleau, C., Bonnefont, J.P., Fekete-Nihoul, C., and Vekemans, M. (2007). Prenatal diagnosis and normal outcome of a 46,XX/46,XY chimera: A Case Report. *Hum. Reprod.* 22, 1037–1041.
- Malki, S., Berta, P., Poulat, F., and Boizet-Bonhoure, B. (2005). Cytoplasmic retention of the sex-determining factor SOX9 via the microtubule network. *Exp. Cell Res.* 309, 468–475.
- Mandel, H., Shemer, R., Borochowitz, Z.U., Okopnik, M., Knopf, C., Indelman, M., Drugan, A., Tiosano, D., Gershoni-Baruch, R., Choder, M., et al. (2008). SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 39–47.
- Mansouri, M.R., Schuster, J., Badhai, J., Stattin, E.-L., Lösel, R., Wehling, M., Carlsson, B., Hovatta, O., Karlström, P.O., Golovleva, I., et al. (2008). Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3776–3783.
- Marozzi, A., Vegetti, W., Manfredini, E., Tibiletti, M.G., Testa, G., Crosignani, P.G., Ginelli, E., Meneveri, R., and Dalprà, L. (2000). Association between idiopathic premature ovarian failure and fragile X premutation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 15, 197–202.
- Martineau, J., Nordqvist, K., Tilmann, C., Lovell-Badge, R., and Capel, B. (1997). Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr. Biol. CB* 7, 958–968.
- Matikainen, T., Perez, G.I., Zheng, T.S., Kluzak, T.R., Rueda, B.R., Flavell, R.A., and Tilly, J.L. (2001). Caspase-3 Gene Knockout Defines Cell Lineage Specificity for Programmed Cell Death Signaling in the Ovary<sup>1</sup>. *Endocrinology* 142, 2468–2480.
- Matson, C.K., and Zarkower, D. (2012). Sex and the singular DM domain: insights into sexual regulation, evolution and plasticity. *Nat. Rev. Genet.* 13, 163–174.
- Matson, C.K., Murphy, M.W., Griswold, M.D., Yoshida, S., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2010). The Mammalian Doublesex Homolog DMRT1 Is a Transcriptional Gatekeeper that Controls the Mitosis versus Meiosis Decision in Male Germ Cells. *Dev. Cell* 19, 612–624.
- Matson, C.K., Murphy, M.W., Sarver, A.L., Griswold, M.D., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2011). DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* 476, 101–104.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey,

- C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., et al. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* *417*, 559–563.
- McElreavey, K., Vilain, E., Abbas, N., Herskowitz, I., and Fellous, M. (1993). A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 3368–3372.
- McGrath, S.A., Esquela, A.F., and Lee, S.J. (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *9*, 131–136.
- McGuire, M.M., Bowden, W., Engel, N.J., Ahn, H.W., Kovanci, E., and Rajkovic, A. (2011). Genomic analysis using high-resolution single-nucleotide polymorphism arrays reveals novel microdeletions associated with premature ovarian failure. *Fertil. Steril.* *95*, 1595–1600.
- Meeks, J.J., Weiss, J., and Jameson, J.L. (2003). Dax1 is required for testis determination. *Nat. Genet.* *34*, 32–33.
- Molkentin, J.D., Lin, Q., Duncan, S.A., and Olson, E.N. (1997). Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* *11*, 1061–1072.
- Moniot, B., Berta, P., Scherer, G., Südbeck, P., and Poulat, F. (2000). Male specific expression suggests role of DMRT1 in human sex determination. *Mech. Dev.* *91*, 323–325.
- Moniot, B., Declosmenil, F., Barrionuevo, F., Scherer, G., Aritake, K., Malki, S., Marzi, L., Cohen-Solal, A., Georg, I., Klattig, J., et al. (2009). The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development* *136*, 1813–1821.
- Monniaux, Caraty, A, Clement, F, Dalmies-Tran, R, Dupont, J, Fabre, S, Gerard, N, Permillod, P, Monget, P, and Uzbekova, S (2009). Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *Inra ProdAnim* *22*, 59–76.
- Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A., and Lovell-Badge, R. (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.* *14*, 62–68.
- Morita, H., Mazerbourg, S., Bouley, D.M., Luo, C.-W., Kawamura, K., Kuwabara, Y., Baribault, H., Tian, H., and Hsueh, A.J.W. (2004). Neonatal Lethality of LGR5 Null Mice Is Associated with Ankyloglossia and Gastrointestinal Distension. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 9736–9743.
- Mullen, R.D., and Behringer, R.R. (2014). Molecular Genetics of Müllerian Duct Formation, Regression and Differentiation. *Sex. Dev.* *8*, 281–296.
- Munger, S.C., Natarajan, A., Looger, L.L., Ohler, U., and Capel, B. (2013). Fine time course expression analysis identifies cascades of activation and repression and maps a putative regulator of mammalian sex determination. *PLoS Genet.* *9*, e1003630.
- Murphy, M.W., Sarver, A.L., Rice, D., Hatzi, K., Ye, K., Melnick, A., Heckert, L.L., Zarkower, D., and Bardwell, V.J. (2010). Genome-wide analysis of DNA binding and transcriptional regulation by the mammalian Doublesex homolog DMRT1 in the juvenile testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 13360–13365.
- Murrell, A. (2011). Setting up and maintaining differential insulators and boundaries for

- genomic imprinting. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 89, 469–478.
- Muscatelli, F., Strom, T.M., Walker, A.P., Zanaria, E., Récan, D., Meindl, A., Bardoni, B., Guioli, S., Zehetner, G., and Rabl, W. (1994). Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 372, 672–676.
- Nachtigal, M.W., Hirokawa, Y., Enyeart-VanHouten, D.L., Flanagan, J.N., Hammer, G.D., and Ingraham, H.A. (1998). Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 93, 445–454.
- Naillat, F., Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Pietila, I., Sormunen, R., Jokela, T., Shan, J., and Vainio, S.J. (2010). Wnt4/5a signalling coordinates cell adhesion and entry into meiosis during presumptive ovarian follicle development. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1539–1550.
- Nef, S., Schaad, O., Stallings, N.R., Cederroth, C.R., Pitetti, J.-L., Schaer, G., Malki, S., Dubois-Dauphin, M., Boizet-Bonhoure, B., Descombes, P., et al. (2005). Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Dev. Biol.* 287, 361–377.
- O'Bryan, M.K., Takada, S., Kennedy, C.L., Scott, G., Harada, S., Ray, M.K., Dai, Q., Wilhelm, D., de Kretser, D.M., Eddy, E.M., et al. (2008). Sox8 is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility. *Dev. Biol.* 316, 359–370.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953–959.
- Ottolenghi, C. (2005). Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2053–2062.
- Ottolenghi, C., and McElreavey, K. (2000). Deletions of 9p and the quest for a conserved mechanism of sex determination. *Mol. Genet. Metab.* 71, 397–404.
- Page, D.C., Mosher, R., Simpson, E.M., Fisher, E.M., Mardon, G., Pollack, J., McGillivray, B., de la Chapelle, A., and Brown, L.G. (1987). The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51, 1091–1104.
- Pailhoux, E., Vigier, B., Chaffaux, S., Servel, N., Taourit, S., Furet, J.P., Fellous, M., Grosclaude, F., Cribiu, E.P., Cotinot, C., et al. (2001). A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat. Genet.* 29, 453–458.
- Paliwal, P., Sharma, A., Birla, S., Kriplani, A., Khadgawat, R., and Sharma, A. (2011). Identification of novel SRY mutations and SF1 (NR5A1) changes in patients with pure gonadal dysgenesis and 46,XY karyotype. *Mol. Hum. Reprod.* 17, 372–378.
- Pangas, S.A., Choi, Y., Ballow, D.J., Zhao, Y., Westphal, H., Matzuk, M.M., and Rajkovic, A. (2006). Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8090–8095.
- Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M.C., Dellambra, E., Valentini, S., Guerra, L., Schedl, A., and Camerino, G. (2006). *R-spondin1* is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat. Genet.* 38, 1304–1309.
- Pearlman, A., Loke, J., Le Caignec, C., White, S., Chin, L., Friedman, A., Warr, N., Willan, J., Brauer, D., Farmer, C., et al. (2010). Mutations in *MAP3K1* Cause 46,XY

- Disorders of Sex Development and Implicate a Common Signal Transduction Pathway in Human Testis Determination. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 898–904.
- Pellegrini, M., Pantano, S., Lucchini, F., Fumi, M., and Forabosco, A. (1997). *Emx2* developmental expression in the primordia of the reproductive and excretory systems. *Anat. Embryol. (Berl.)* 196, 427–433.
- Peluso, J.J. (2013). Progesterone receptor membrane component 1 and its role in ovarian follicle growth. *Front. Neurosci.* 7.
- Pepling, M.E., and Spradling, A.C. (2001). Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordial Follicles. *Dev. Biol.* 234, 339–351.
- Perez, G.I., Robles, R., Knudson, C.M., Flaws, J.A., Korsmeyer, S.J., and Tilly, J.L. (1999). Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nat. Genet.* 21, 200–203.
- Persani, L., Rossetti, R., Di Pasquale, E., Cacciatore, C., and Fabre, S. (2014). The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum. Reprod. Update* 20, 869–883.
- Piard, J., Mignot, B., Arbez-Gindre, F., Aubert, D., Morel, Y., Roze, V., McElreavy, K., Jonveaux, P., Valduga, M., and Van Maldergem, L. (2014). Severe sex differentiation disorder in a boy with a 3.8 Mb 10q25.3-q26.12 microdeletion encompassing *EMX2*. *Am. J. Med. Genet. A.* 164, 2618–2622.
- Pierce, S.B., Walsh, T., Chisholm, K.M., Lee, M.K., Thornton, A.M., Fiumara, A., Opitz, J.M., Levy-Lahad, E., Klevit, R.E., and King, M.-C. (2010). Mutations in the DBP-Deficiency Protein HSD17B4 Cause Ovarian Dysgenesis, Hearing Loss, and Ataxia of Perrault Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 282–288.
- Pisarska, M.D., Barlow, G., and Kuo, F.-T. (2011). Minireview: Roles of the Forkhead Transcription Factor FOXL2 in Granulosa Cell Biology and Pathology. *Endocrinology* 152, 1199–1208.
- Polanco, J.C., Wilhelm, D., Davidson, T.-L., Knight, D., and Koopman, P. (2010). Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Hum. Mol. Genet.* 19, 506–516.
- Pritchard, C.A., Goodfellow, P.J., and Goodfellow, P.N. (1987). Isolation of a sequence which maps close to the human sex determining gene. *Nucleic Acids Res.* 15, 6159–6169.
- Pritchard-Jones, K., Fleming, S., Davidson, D., Bickmore, W., Porteous, D., Gosden, C., Bard, J., Buckler, A., Pelletier, J., Housman, D., et al. (1990). The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 346, 194–197.
- Prueitt, R.L., Ross, J.L., and Zinn, A.R. (2000). Physical mapping of nine Xq translocation breakpoints and identification of XPNPEP2 as a premature ovarian failure candidate gene. *Cytogenet. Cell Genet.* 89, 44–50.
- Qin, L., Wang, J., Tian, X., Yu, H., Truong, C., Mitchell, J.J., Wierenga, K.J., Craigen, W.J., Zhang, V.W., and Wong, L.-J.C. (2016). Detection and Quantification of Mosaic Mutations in Disease Genes by Next-Generation Sequencing. *J. Mol. Diagn.* 18, 446–453.
- Qin, Y., Jiao, X., Dagleish, R., Vujovic, S., Li, J., Simpson, J.L., Al-Azzawi, F., and Chen,

- Z.-J. (2014). Novel variants in the SOHLH2 gene are implicated in human premature ovarian failure. *Fertil. Steril.* *101*, 1104–1109.e6.
- Qin, Y., Jiao, X., Simpson, J.L., and Chen, Z.-J. (2015). Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum. Reprod. Update* *21*, 787–808.
- Quinonez, S.C., Park, J.M., Rabah, R., Owens, K.M., Yashar, B.M., Glover, T.W., and Keegan, C.E. (2013). 9p partial monosomy and disorders of sex development: Review and postulation of a pathogenetic mechanism. *Am. J. Med. Genet. A.* *161*, 1882–1896.
- Rajkovic, A., Pangas, S.A., Ballow, D., Suzumori, N., and Matzuk, M.M. (2004). NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* *305*, 1157–1159.
- Rannikko, A., Pakarinen, P., Manna, P.R., Beau, I., Misrahi, M., Aittomäki, K., and Huhtaniemi, I. (2002). Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation. *Mol. Hum. Reprod.* *8*, 311–317.
- Raymond, C.S., Murphy, M.W., O’Sullivan, M.G., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2000). Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* *14*, 2587–2595.
- Reddy, P., Shen, L., Ren, C., Boman, K., Lundin, E., Ottander, U., Lindgren, P., Liu, Y.-X., Sun, Q.-Y., and Liu, K. (2005). Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHRL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Dev. Biol.* *281*, 160–170.
- Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., Du, C., Tang, W., Ha ma la inen, T., Peng, S.L., et al. (2008). Oocyte-Specific Deletion of Pten Causes Premature Activation of the Primordial Follicle Pool. *Science* *319*, 611–613.
- Ren, Y., Suzuki, H., Jagarlamudi, K., Golnoski, K., McGuire, M., Lopes, R., Pachnis, V., and Rajkovic, A. (2015). Lhx8 regulates primordial follicle activation and postnatal folliculogenesis. *BMC Biol.* *13*.
- Roberts, A.B. (1998). Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner. Electrolyte Metab.* *24*, 111–119.
- Rose, E.A., Glaser, T., Jones, C., Smith, C.L., Lewis, W.H., Call, K.M., Minden, M., Champagne, E., Bonetta, L., Yeger, H., et al. (1990). Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms’ tumor gene. *Cell* *60*, 495–508.
- Rossetti, R., Di Pasquale, E., Marozzi, A., Bione, S., Toniolo, D., Grammatico, P., Nelson, L.M., Beck-Peccoz, P., and Persani, L. (2009). BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum. Mutat.* *30*, 804–810.
- Rucker, E.B., Dierisseau, P., Wagner, K.-U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., Flaws, J.A., and Hennighausen, L. (2000). Bcl-x and Bax Regulate Mouse Primordial Germ Cell Survival and Apoptosis during Embryogenesis. *Mol. Endocrinol.* *14*, 1038–1052.
- Schepers, G., Wilson, M., Wilhelm, D., and Koopman, P. (2003). SOX8 is expressed during testis differentiation in mice and synergizes with SF1 to activate the Amh promoter in vitro. *J. Biol. Chem.* *278*, 28101–28108.
- Schoenwolf, G.C. (2009). Larsen’s human embryology (Philadelphia: Churchill

- Livingstone/Elsevier).
- Sekido, R., and Lovell-Badge, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453, 930–934.
- Sekido, R., Bar, I., Narváez, V., Penny, G., and Lovell-Badge, R. (2004). SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev. Biol.* 274, 271–279.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240–244.
- Smith, E., and Shilatifard, A. (2014). Enhancer biology and enhanceropathies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 210–219.
- Smith, C.A., Roeszler, K.N., Ohnesorg, T., Cummins, D.M., Farlie, P.G., Doran, T.J., and Sinclair, A.H. (2009). The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461, 267–271.
- Soung, Y., Lee, J., Kim, S., Park, W., Nam, S., Lee, J., Yoo, N., and Lee, S. (2004). Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Hum. Genet.* 115.
- Soyal, S.M., Amleh, A., and Dean, J. (2000). FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Dev. Camb. Engl.* 127, 4645–4654.
- Stokoe, D. (2005). The phosphoinositide 3-kinase pathway and cancer. *Expert Rev. Mol. Med.* 7, 1–22.
- Sutton, E., Hughes, J., White, S., Sekido, R., Tan, J., Arboleda, V., Rogers, N., Knowler, K., Rowley, L., Eyre, H., et al. (2011). Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 121, 328–341.
- Suzumori, N., Yan, C., Matzuk, M.M., and Rajkovic, A. (2002). Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes. *Mech. Dev.* 111, 137–141.
- Swain, A., Narvaez, V., Burgoyne, P., Camerino, G., and Lovell-Badge, R. (1998). Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 391, 761–767.
- Sybert, V.P., and McCauley, E. (2004). Turner’s syndrome. *N. Engl. J. Med.* 351, 1227–1238.
- Takegami, Y., Ohkawara, B., Ito, M., Masuda, A., Nakashima, H., Ishiguro, N., and Ohno, K. (2016). R-spondin 2 facilitates differentiation of proliferating chondrocytes into hypertrophic chondrocytes by enhancing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in endochondral ossification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473, 255–264.
- Tassone, F., Beilina, A., Carosi, C., Albertosi, S., Bagni, C., Li, L., Glover, K., Bentley, D., and Hagerman, P.J. (2007). Elevated FMR1 mRNA in premutation carriers is due to increased transcription. *RNA* 13, 555–562.
- Tay, J., and Richter, J.D. (2001). Germ cell differentiation and synaptonemal complex formation are disrupted in CPEB knockout mice. *Dev. Cell* 1, 201–213.
- Tevosian, S.G., Albrecht, K.H., Crispino, J.D., Fujiwara, Y., Eicher, E.M., and Orkin, S.H. (2002). Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Dev. Camb. Engl.* 129, 4627–4634.

- Tobias, E.S., and McElreavey, K. (2014). Next Generation Sequencing for Disorders of Sex Development. In *Endocrine Development*, O. Hiort, and S.F. Ahmed, eds. (Basel: S. KARGER AG), pp. 53–62.
- Uda, M. (2004). Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 1171–1181.
- Uhlenhaut, N.H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A.-C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N.I., et al. (2009). Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell* *139*, 1130–1142.
- Ulloa-Aguirre, A., Zariñán, T., Pasapera, A.M., Casas-González, P., and Dias, J.A. (2007). Multiple facets of follicle-stimulating hormone receptor function. *Endocrine* *32*, 251–263.
- Umehara, F., Tate, G., Itoh, K., Yamaguchi, N., Douchi, T., Mitsuya, T., and Osame, M. (2000). A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy. *Am. J. Hum. Genet.* *67*, 1302–1305.
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., and McMahon, A.P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* *397*, 405–409.
- Vanorny, D.A., Prasasya, R.D., Chalpe, A.J., Kilen, S.M., and Mayo, K.E. (2014). Notch Signaling Regulates Ovarian Follicle Formation and Coordinates Follicular Growth. *Mol. Endocrinol.* *28*, 499–511.
- Veitia, R., Ion, A., Barboux, S., Jobling, M.A., Souleyreau, N., Ennis, K., Ostrer, H., Tosi, M., Meo, T., Chibani, J., et al. (1997). Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. *Hum. Genet.* *99*, 648–652.
- Vetro, A., Ciccone, R., Giorda, R., Patricelli, M.G., Della Mina, E., Forlino, A., and Zuffardi, O. (2011). XX males SRY negative: a confirmed cause of infertility. *J. Med. Genet.* *48*, 710–712.
- Vetro, A., Dehghani, M.R., Kraoua, L., Giorda, R., Beri, S., Cardarelli, L., Merico, M., Manolakos, E., Parada-Bustamante, A., Castro, A., et al. (2015). Testis development in the absence of SRY: chromosomal rearrangements at SOX9 and SOX3. *Eur. J. Hum. Genet.* *23*, 1025–1032.
- Vialard, F., Ottolenghi, C., Gonzales, M., Choiset, A., Girard, S., Siffroi, J.P., McElreavey, K., Vibert-Guigue, C., Sebaoun, M., Joyé, N., et al. (2002). Deletion of 9p associated with gonadal dysfunction in 46,XY but not in 46,XX human fetuses. *J. Med. Genet.* *39*, 514–518.
- Viger, R.S., Mertineit, C., Trasler, J.M., and Nemer, M. (1998). Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 2665–2675.
- Virant-Klun, I., Ståhlberg, A., Kubista, M., and Skutella, T. (2016). MicroRNAs: From Female Fertility, Germ Cells, and Stem Cells to Cancer in Humans. *Stem Cells Int.* *2016*, 1–17.
- Voican, A., Bachelot, A., Bouligand, J., Francou, B., Dulon, J., Lombès, M., Touraine, P., and Guiochon-Mantel, A. (2013). *NR5A1* (SF-1) Mutations Are Not a Major Cause of

- Primary Ovarian Insufficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, E1017–E1021.
- Wang, B., Mu, Y., Ni, F., Zhou, S., Wang, J., Cao, Y., and Ma, X. (2010). Analysis of FOXO3 mutation in 114 Chinese women with premature ovarian failure. *Reprod. Biomed. Online* 20, 499–503.
- Wang, H., Nettleton, D., and Ying, K. (2014a). Copy number variation detection using next generation sequencing read counts. *BMC Bioinformatics* 15, 109.
- Wang, J.-L., Li, S.-L., Qin, Y.-Y., and Chen, Z.-J. (2014b). Analysis of progesterone receptor membrane component 1 mutation in Han Chinese women with premature ovarian failure. *Reprod. Biomed. Online* 29, 640–643.
- Warr, N., Carre, G.-A., Siggers, P., Faleato, J.V., Brixey, R., Pope, M., Bogani, D., Childers, M., Wells, S., Scudamore, C.L., et al. (2012). Gadd45 $\gamma$  and Map3k4 Interactions Regulate Mouse Testis Determination via p38 MAPK-Mediated Control of Sry Expression. *Dev. Cell* 23, 1020–1031.
- Watkins, W., Umbers, A., Woad, K., Harris, S., Winship, I., Gersak, K., and Shelling, A. (2006). Mutational screening of FOXO3A and FOXO1A in women with premature ovarian failure. *Fertil. Steril.* 86, 1518–1521.
- Weiss, J., Meeks, J.J., Hurley, L., Raverot, G., Frassetto, A., and Jameson, J.L. (2003). Sox3 Is Required for Gonadal Function, but Not Sex Determination, in Males and Females. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8084–8091.
- Wilhelm, D. (2002). The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev.* 16, 1839–1851.
- Wilhelm, D., Palmer, S., and Koopman, P. (2007a). Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiol. Rev.* 87, 1–28.
- Wilhelm, D., Hiramatsu, R., Mizusaki, H., Widjaja, L., Combes, A.N., Kanai, Y., and Koopman, P. (2007b). SOX9 Regulates Prostaglandin D Synthase Gene Transcription in Vivo to Ensure Testis Development. *J. Biol. Chem.* 282, 10553–10560.
- Wilkie, A.O.M., Campbell, F.M., Daubeney, P., Grant, D.B., Daniels, R.J., Mullarkey, M., Affara, N.A., Fitchett, M., and Huson, S.M. (1993). Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of 10q: Report of 2 cases and literature review. *Am. J. Med. Genet.* 46, 597–600.
- Xiao, B., Ji, X., Xing, Y., Chen, Y.-W., and Tao, J. (2013). A rare case of 46, XX SRY-negative male with a ~74-kb duplication in a region upstream of SOX9. *Eur. J. Med. Genet.* 56, 695–698.
- Xu, J., and Gridley, T. (2013). Notch2 is required in somatic cells for breakdown of ovarian germ-cell nests and formation of primordial follicles. *BMC Biol.* 11, 13.
- Yamada, G., Satoh, Y., Baskin, L.S., and Cunha, G.R. (2003). Cellular and molecular mechanisms of development of the external genitalia. *Differentiation* 71, 445–460.
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F.J., Elvin, J.A., Carino, C., Prasad, S.V., Skinner, S.S., Dunbar, B.S., Dube, J.L., et al. (2001). Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function. *Mol. Endocrinol.* 15, 854–866.
- Yao, H.H.-C., Whoriskey, W., and Capel, B. (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev.* 16, 1433–1440.

- Yao, H.H.C., Matzuk, M.M., Jorgez, C.J., Menke, D.B., Page, D.C., Swain, A., and Capel, B. (2004). Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 230, 210–215.
- Yau, S.C., Bobrow, M., Mathew, C.G., and Abbs, S.J. (1996). Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J. Med. Genet.* 33, 550–558.
- Yoshida, H., Takakura, N., Kataoka, H., Kunisada, T., Okamura, H., and Nishikawa, S.I. (1997). Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev. Biol.* 184, 122–137.
- Zenteno-Ruiz, J.C., Kofman-Alfaro, S., and Méndez, J.P. (2001). 46,XX sex reversal. *Arch. Med. Res.* 32, 559–566.
- Zhang, X., Liu, R., Su, Z., Zhang, Y., Zhang, W., Liu, X., Wang, F., Guo, Y., Li, C., and Hao, J. (2015). Immunohistochemical Study of Expression of Sohlh1 and Sohlh2 in Normal Adult Human Tissues. *PLOS ONE* 10, e0137431.
- Zhao, H., Chen, Z.-J., Qin, Y., Shi, Y., Wang, S., Choi, Y., Simpson, J.L., and Rajkovic, A. (2008). Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 1342–1348.
- Zhao, M., Wang, Q., Wang, Q., Jia, P., and Zhao, Z. (2013). Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. *BMC Bioinformatics* 14, S1.
- Zhao, S., Li, G., Dalgleish, R., Vujovic, S., Jiao, X., Li, J., Simpson, J.L., Qin, Y., Ivanisevic, M., Iovic, M., et al. (2015). Transcription factor SOHLH1 potentially associated with primary ovarian insufficiency. *Fertil. Steril.* 103, 548–553.e5.
- Zhu, C., Zheng, X.-F., Yang, Y.-H., Li, B., Wang, Y.-R., Jiang, S.-D., and Jiang, L.-S. (2016). LGR4 acts as a key receptor for R-spondin 2 to promote osteogenesis through Wnt signaling pathway. *Cell. Signal.* 28, 989–1000.
- Zlotogora, J., Sagi, M., and Cohen, T. (1983). The blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome: delineation of two types. *Am. J. Hum. Genet.* 35, 1020–1027.

## **Annexes**

## Annexe 1

Table des CNVs identifiés dans la cohorte de patients DSD 46,XX avec développement testiculaire ou ovotesticulaire.

Patient	Interprétation	Type de remaniement	Chromosome	Début	Fin	Taille (pb)	Formule
T1	Benign	Deletion	2	89943629	90247720	304092	arr[hg19] 2p11.2(89,943,629-90,247,720)x1
	Benign	Homozygous deletion	16	223626	225653	2028	arr[hg19] 16p13.3(223,626-225,653)x0
	Benign	Duplication	17	34444121	34630969	186849	arr[hg19] 17q12(34,444,121-34,630,969)x3
	Pathogenic	Duplication	17	69493864	69570941	77078	arr[hg19] 17q24.3(69,493,864-69,570,941)x3
T2	Benign	Deletion	2	90027811	90247720	219910	arr[hg19] 2p11.2(90,027,811-90,247,720)x1
	Pathogenic	Duplication	17	69493864	69570941	77078	arr[hg19] 17q24.3(69,493,864-69,570,941)x3
	Benign	Duplication	19	15785643	15837869	52227	arr[hg19] 19p13.12(15,785,643-15,837,869)x3
T3	Benign	Duplication	19	53522101	53548950	26850	arr[hg19] 19q13.41(53,522,101-53,548,950)x3
	Pathogenic	Duplication	7	76134203	76137375	3173	arr[hg19] 7q11.23(76,134,203-76,137,375)x3
T4	Benign	Duplication	17	69441277	69581849	140573	arr[hg19] 17q24.3(69,441,277-69,581,849)x3
T5	Benign	Deletion	13	57820868	57888986	68119	arr[hg19] 13q21.1(57,820,868-57,888,986)x1
T6	Benign	Duplication	8	8101642	8145440	43799	arr[hg19] 8p23.1(8,101,642-8,145,440)x3
	Benign	Duplication	10	69359021	69448289	89269	arr[hg19] 10q21.3(69,359,021-69,448,289)x3
	Benign	Deletion	11	25134742	25284208	149467	arr[hg19] 11p14.3(25,134,742-25,284,208)x1
	Benign	Duplication	11	87939593	87948151	8559	arr[hg19] 11q14.2(87,939,593-87,948,151)x3
T7	Benign	Duplication	17	34438213	34630969	192757	arr[hg19] 17q12(34,438,213-34,630,969)x3
	Benign	Duplication	4	9370908	9456977	86070	arr[hg19] 4p16.1(9,370,908-9,456,977)x3
	Benign	Deletion	10	55121585	55371601	250017	arr[hg19] 10q21.1(55,121,585-55,371,601)x1
T8	Benign	Duplication	17	5457838	5723782	265945	arr[hg19] 17p13.2(5,457,838-5,723,782)x3
	Benign	Deletion	14	20684277	20731130	46854	arr[hg19] 14q11.2(20,684,277-20,731,130)x1
	Benign	Homozygous deletion	16	223625	225653	2029	arr[hg19] 16p13.3(223,625-225,653)x0
	Benign	Deletion	16	33795687	34020957	225271	arr[hg19] 16p11.2(33,795,687-34,020,957)x1

T9	Benign	Homozygous deletion	2	6304638	6307401	2764	arr[hg19] 2p25.2(6,304,638-6,307,401)x0
	Benign	Deletion	10	56957207	56996554	39348	arr[hg19] 10q21.1(56,957,207-56,996,554)x1
	Benign	Deletion	10	135257091	135378802	121712	arr[hg19] 10q26.3(135,257,091-135,378,802)x1
	Benign	Duplication	20	50684980	50699305	14326	arr[hg19] 20q13.2(50,684,980-50,699,305)x3
T10	Benign	Multiplication	1	155194980	155203060	8081	arr[hg19] 1q22(155,194,980-155,203,060)x4
	Benign	Duplication	20	50684653	50697019	12367	arr[hg19] 20q13.2(50,684,653-50,697,019)x3
T11	Benign	Homozygous deletion	1	69944198	69951760	7563	arr[hg19] 1p31.1(69,944,198-69,951,760)x0
	Benign	Homozygous deletion	2	215501876	215514980	13105	arr[hg19] 2q35(215,501,876-215,514,980)x0
	Benign	Homozygous deletion	3	131399961	131409530	9570	arr[hg19] 3q22.1(131,399,961-131,409,530)x0
	Benign	Homozygous deletion	3	158001555	158030382	28828	arr[hg19] 3q25.32(158,001,555-158,030,382)x0
	Benign	Homozygous deletion	3	186108018	186126310	18293	arr[hg19] 3q27.3(186,108,018-186,126,310)x0
	Benign	Homozygous deletion	3	187896912	187898593	1682	arr[hg19] 3q27.3(187,896,912-187,898,593)x0
	Benign	Homozygous deletion	3	190035825	190037414	1590	arr[hg19] 3q28(190,035,825-190,037,414)x0
	Benign	Duplication	4	70003963	70013537	9575	arr[hg19] 4q13.2(70,003,963-70,013,537)x3
	Benign	Homozygous deletion	6	142076325	142112455	36131	arr[hg19] 6q24.1(142,076,325-142,112,455)x0
	Benign	Homozygous deletion	7	114784028	114792582	8555	arr[hg19] 7q31.2(114,784,028-114,792,582)x0
	Benign	Homozygous deletion	8	73736766	73741773	5008	arr[hg19] 8q13.3(73,736,766-73,741,773)x0
	Benign	Homozygous deletion	8	79526456	79548197	21742	arr[hg19] 8q21.12(79,526,456-79,548,197)x0
	Benign	Homozygous deletion	9	103353017	103366326	13310	arr[hg19] 9q31.1(103,353,017-103,366,326)x0
	Benign	Deletion	10	47543322	47650490	107169	arr[hg19] 10q11.22(47,543,322-47,650,490)x1
	Benign	Homozygous deletion	14	72755506	72760708	5203	arr[hg19] 14q24.2(72,755,506-72,760,708)x0
	Benign	Homozygous deletion	16	11477919	11481845	3927	arr[hg19] 16p13.13(11,477,919-11,481,845)x0
	Benign	Homozygous deletion	18	56211453	56213438	1986	arr[hg19] 18q21.32(56,211,453-56,213,438)x0
	Benign	Homozygous deletion	18	57525833	57532084	6252	arr[hg19] 18q21.32(57,525,833-57,532,084)x0
	Benign	Homozygous deletion	19	17394504	17399476	4973	arr[hg19] 19p13.11(17,394,504-17,399,476)x0
	Benign	Homozygous deletion	19	24175453	24182287	6835	arr[hg19] 19p12(24,175,453-24,182,287)x0
Benign	Homozygous deletion	19	43028621	43035370	6750	arr[hg19] 19q13.2(43,028,621-43,035,370)x0	
Benign	Duplication	X	62321	220770	158450	arr[hg19] Xp22.33(62,321-220,770)x3	

Annexes

T12	Benign	Deletion	9	11967114	12013711	46598	arr[hg19] 9p23(11,967,114-12,013,711)x1
	Benign	Duplication	9	119525648	119533737	8090	arr[hg19] 9q33.1(119,525,648-119,533,737)x3
	Benign	Deletion	10	47543322	47650490	107169	arr[hg19] 10q11.22(47,543,322-47,650,490)x1
	Benign	Duplication	14	40138562	40461852	323291	arr[hg19] 14q21.1(40,138,562-40,461,852)x3
	Benign	Duplication	19	53332039	53344701	12663	arr[hg19] 19q13.41(53,332,039-53,344,701)x3
	Benign	Duplication	22	25707443	25909255	201813	arr[hg19] 22q11.23q12.1(25,707,443-25,909,255)x3
T13	Benign	Duplication	13	95538248	95721660	183412	arr[hg19] 13q32.1(95,538,248-95,721,660)x3
	Benign	Homozygous deletion	17	31642707	31655082	12375	arr[hg19] 17q11.2(31,642,707-31,655,082)x0
T14	Benign	Deletion	1	196712624	196901753	189130	arr[hg19] 1q31.3(196,712,624-196,901,753)x1
	Benign	Homozygous deletion	2	214885653	214908936	23284	arr[hg19] 2q34(214,885,653-214,908,936)x0
	Benign	Homozygous deletion	4	28958205	28972033	13829	arr[hg19] 4p15.1(28,958,205-28,972,033)x0
	Benign	Homozygous deletion	4	95170839	95262665	91827	arr[hg19] 4q22.3(95,170,839-95,262,665)x0
	Benign	Homozygous deletion	4	172944925	172950660	5736	arr[hg19] 4q34.1(172,944,925-172,950,660)x0
	Benign	Homozygous deletion	6	105203774	105230729	26956	arr[hg19] 6q16.3(105,203,774-105,230,729)x0
	Benign	Homozygous deletion	7	112601599	112636408	34810	arr[hg19] 7q31.1(112,601,599-112,636,408)x0
	Benign	Homozygous deletion	8	17580791	17581700	910	arr[hg19] 8p22(17,580,791-17,581,700)x0
	Benign	Homozygous deletion	10	20311913	20318802	6890	arr[hg19] 10p12.31(20,311,913-20,318,802)x0
	Benign	Deletion	10	63300506	63336317	35812	arr[hg19] 10q21.2(63,300,506-63,336,317)x1
	Benign	Homozygous deletion	12	24299945	24313450	13506	arr[hg19] 12p12.1(24,299,945-24,313,450)x0
	Benign	Homozygous deletion	12	24416903	24432497	15595	arr[hg19] 12p12.1(24,416,903-24,432,497)x0
	Benign	Homozygous deletion	13	70399003	70422282	23280	arr[hg19] 13q21.33(70,399,003-70,422,282)x0
	Benign	Homozygous deletion	13	93570669	93582208	11540	arr[hg19] 13q31.3(93,570,669-93,582,208)x0
	Benign	Deletion	15	62128861	62340126	211266	arr[hg19] 15q22.2(62,128,861-62,340,126)x1
	Benign	Homozygous deletion	18	29193385	29207155	13771	arr[hg19] 18q12.1(29,193,385-29,207,155)x0
	Benign	Homozygous deletion	18	67206541	67217271	10731	arr[hg19] 18q22.2(67,206,541-67,217,271)x0
	Benign	Homozygous deletion	22	23288277	23291613	3337	arr[hg19] 22q11.22(23,288,277-23,291,613)x0
T15	Benign	Duplication	1	155180466	155203060	22595	arr[hg19] 1q22(155,180,466-155,203,060)x3
	Benign	Duplication	9	72036369	72047599	11231	arr[hg19] 9q21.11(72,036,369-72,047,599)x3

	Benign	Duplication	11	96629896	96666819	36924	arr[hg19] 11q21(96,629,896-96,666,819)x3
	Benign	Duplication	11	134576216	134598043	21828	arr[hg19] 11q25(134,576,216-134,598,043)x3
	Benign	Deletion	14	27577719	27732976	155258	arr[hg19] 14q12(27,577,719-27,732,976)x1
	Benign	Duplication	17	400959	463043	62085	arr[hg19] 17p13.3(400,959-463,043)x3
	Benign	Duplication	17	34453522	34475131	21610	arr[hg19] 17q12(34,453,522-34,475,131)x3
	Benign	Duplication	19	22422889	22438069	15181	arr[hg19] 19p12(22,422,889-22,438,069)x3
	Benign	Duplication	22	36649966	36702300	52335	arr[hg19] 22q12.3(36,649,966-36,702,300)x3
T16	Benign	Duplication	5	17745762	17780459	34698	arr[hg19] 5p15.1(17,745,762-17,780,459)x3
	Benign	Duplication	6	78848097	79039234	191138	arr[hg19] 6q14.1(78,848,097-79,039,234)x3
	Benign	Deletion	8	4617810	4814303	196494	arr[hg19] 8p23.2(4,617,810-4,814,303)x1
	Benign	Deletion	10	56957207	56996554	39348	arr[hg19] 10q21.1(56,957,207-56,996,554)x1
	Benign	Deletion	11	56326343	56352417	26075	arr[hg19] 11q12.1(56,326,343-56,352,417)x1
	Benign	Homozygous deletion	19	20631948	20682055	50108	arr[hg19] 19p12(20,631,948-20,682,055)x0
T17	Benign	Deletion	1	152984397	153101488	117092	arr[hg19] 1q21.3(152,984,397-153,101,488)x1
	Benign	Duplication	2	18116319	18192841	76523	arr[hg19] 2p24.2(18,116,319-18,192,841)x3
	Benign	Deletion	6	67017494	67047294	29801	arr[hg19] 6q12(67,017,494-67,047,294)x1
	Benign	Deletion	7	8827959	8856074	28116	arr[hg19] 7p21.3(8,827,959-8,856,074)x1
	Benign	Deletion	9	16931342	16987379	56038	arr[hg19] 9p22.2(16,931,342-16,987,379)x1
	Benign	Duplication	10	47412588	47702515	289928	arr[hg19] 10q11.22(47,412,588-47,702,515)x3
	Benign	Duplication	10	135252347	135377448	125102	arr[hg19] 10q26.3(135,252,347-135,377,448)x3
	Benign	Duplication	12	124115811	124195483	79673	arr[hg19] 12q24.31(124,115,811-124,195,483)x3
T18	Benign	Duplication	2	133280890	133308437	27548	arr[hg19] 2q21.2(133,280,890-133,308,437)x3
	Benign	Duplication	3	19562980	19684181	121202	arr[hg19] 3p24.3(19,562,980-19,684,181)x3
	Benign	Duplication	16	75539436	75575410	35975	arr[hg19] 16q23.1(75,539,436-75,575,410)x3
	Benign	Duplication	19	15776945	15783630	6686	arr[hg19] 19p13.12(15,776,945-15,783,630)x3
	Benign	Duplication	19	15797484	15830869	33386	arr[hg19] 19p13.12(15,797,484-15,830,869)x3
	Benign	Duplication	20	50684653	50697019	12367	arr[hg19] 20q13.2(50,684,653-50,697,019)x3



## Table des illustrations

Figure 1. Schémas d'une coupe transversale d'embryon au niveau de la région du mésonéphros lors du développement de la gonade bi-potentielle au cours de la 5 <sup>ème</sup> semaine et à la fin de la 6 <sup>ème</sup> semaine de développement. ....	17
Figure 2. Schéma des conduits génitaux au stade indifférencié vers la fin de la 6 <sup>ème</sup> semaine de développement. ....	20
Figure 3. Aspect des organes génitaux externes à la fin de la 8 <sup>ème</sup> semaine de développement. ....	21
Figure 4. Aperçu des facteurs impliqués dans le développement de la gonade bi-potentielle. ....	28
Figure 5. Modèle de l'activité pro-testiculaire de DAX1 en fonction de la gamme de concentration. ....	37
Figure 6. Représentation schématique des principaux facteurs impliqués dans le développement testiculaire. ....	40
Figure 7. Schéma de la voie de signalisation WNT avec les protéines RSPO. ....	42
Figure 8. Schéma récapitulatif des facteurs impliqués dans le développement gonadique ovarien. ....	46
Figure 9. Schéma de la région <i>RevSex</i> identifiée par Benko et al. (Benko et al., 2011). ....	53
Figure 10. Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire d'après (Monniaux et al., 2009). ....	56
Figure 11. Schéma des principaux facteurs et voies de signalisation impliqués dans le développement folliculaire basal. (RA : acide rétinoïque). ....	64
Figure 12. Structure de la protéine FOXL2 qui contient un domaine Forkhead dans sa partie N terminale et un stretch poly-alanine. ....	68
Figure 13. Schéma représentant les différents mécanismes de duplication. ....	82
Figure 14. Schéma de la localisation des sondes TaqMan dans la région <i>RevSex</i> . ....	87
Figure 15. Résultats de qPCR TaqMan pour les CNV1-SOX9 et CNV4-SOX9. ....	95
Figure 16. Profil SNP array de la région 17q24.3 chez le patient P35. ....	96
Figure 17. Schéma de la structure des différents membres de la famille des protéines R-spondines. ....	104
Figure 18. Mécanisme de formation des chimères d'après (Malan et al., 2006). ....	106
Figure 19. Schéma de la protéine LGR5. ....	107
Figure 20. Résultat de l'analyse par QMPSF pour la patiente 2 montrant une délétion des trois exons testés de <i>CPEB1</i> : E3, E4 et E12. Le gène <i>DMD</i> codant pour la dystrophine située sur le chromosome X sert de témoin. ....	111
Figure 21. Résultat puce SNP patiente 3 montrant une délétion d'environ 1,6 Mb sur le chromosome 15 en 15q26.2. ....	112



## Table des tableaux

Tableau 1. Tableau des groupes de gènes <i>SOX</i> .....	34
Tableau 2. Proposition de nouvelle nomenclature pour les anomalies du développement sexuel (Hughes et al., 2006).....	47
Tableau 3. Proposition de classification des DSD (Hughes et al., 2006).....	48
Tableau 4. Gènes impliqués dans les DSD 46,XY avec CGD ou PGD.....	51
Tableau 5. Gènes et régions régulatrices impliqués dans les DSD 46,XX avec développement testiculaire ou ovotesticulaire.....	54
Tableau 6. Causes chromosomiques d'IOP.....	67
Tableau 7. Principaux syndromes ou maladies avec les gènes impliqués dans les IOP syndromiques.....	70
Tableau 8. Gènes les plus fréquemment impliqués dans les IOP non syndromiques.....	72
Tableau 9 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR des exons 1 à 12 du gène <i>CPEB1</i> .....	80
Tableau 10 : Amorces utilisées pour la réaction de séquence du gène <i>CPEB1</i> .....	81
Tableau 11. Couples d'amorces et tampons testés pour la long-range PCR.....	83
Tableau 12. Séquence des amorces utilisées pour séquencer le fragment contenant le point de cassure.....	84
Tableau 13 : Amorces utilisées pour la PCR multiplex pour la QMPSF du gène <i>CPEB1</i> .....	85
Tableau 14. Amorces et sondes utilisés pour les expériences TaqMan dans la région <i>RevSex</i> en amont du gène <i>SOX9</i> .....	87
Tableau 15. Ressources bio-informatiques utilisées pour l'élaboration et l'interprétation des données.....	89
Tableau 16. Description clinique et histologique ainsi que les réarrangements identifiés chez les trois patients.....	92
Tableau 17. Description de la cohorte P testée pour la recherche d'un remaniement de la région minimale <i>RevSex</i> .....	94
Tableau 18. Caractéristiques cliniques de la cohorte DSD 46,XX.....	99
Tableau 19. CNVs identifiés dans la cohorte DSD 46,XX avec développement testiculaire.....	101
Tableau 20. Régions de ROH communes à au moins deux patients.....	101
Tableau 21. Nombres de variants identifiés lors du séquençage d'exome pour les 10 patients de la cohorte DSD avec développement testiculaire.....	102
Tableau 22. CNVs identifiés chez le cas index.....	108
Tableau 23. Polymorphismes identifiés dans le gène <i>CPEB1</i> dans la cohorte de 95 patientes présentant une aménorrhée primaire ou secondaire.....	110

*Table des tableaux*

---

Tableau 24. CNVs n'étant pas rapportés comme pathogène ou non pathogène dans les bases de données. ....	116
Tableau 25. Régions communes de ROH chez les patients et les apparentés.....	117

**Article 1 : Refining the Regulatory Region Upstream of  
*SOX9* Associated With 46,XX Testicular Disorders of  
SexDevelopment (DSD)**



## Refining the Regulatory Region Upstream of *SOX9* Associated With 46,XX Testicular Disorders of Sex Development (DSD)

Capucine Hyon,<sup>1,2,3\*</sup> Sandra Chantot-Bastaraud,<sup>1</sup> Radu Harbuz,<sup>4</sup> Rakia Bhourri,<sup>1</sup> Nicolas Perrot,<sup>5</sup> Matthieu Peycelon,<sup>2</sup> Mathilde Sibony,<sup>6</sup> Sandra Rojo,<sup>7</sup> Xavier Piguel,<sup>8</sup> Frederic Bilan,<sup>4</sup> Brigitte Gilbert-Dussardier,<sup>4,9</sup> Alain Kitzis,<sup>4</sup> Ken McElreavey,<sup>7</sup> Jean-Pierre Siffroi,<sup>1,2,3</sup> and Anu Bashamboo<sup>7</sup>

<sup>1</sup>AP-HP, Hôpitaux Universitaires Est Parisien, Hôpital Trousseau, Service de Génétique et d'Embryologie médicales, Paris, France

<sup>2</sup>INSERM UMR S933, Paris, France

<sup>3</sup>UPMC Univ Paris 06, UFR de Médecine Pierre et Marie Curie, Paris, France

<sup>4</sup>Service Génétique Médicale, CHU Poitiers, France

<sup>5</sup>Department of Radiology, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Est Parisien, Hôpital Tenon, Paris, France

<sup>6</sup>Department of Pathology, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Est Parisien, Hôpital Tenon, Paris, France

<sup>7</sup>Institut Pasteur, Human Developmental Genetics, Paris, France

<sup>8</sup>Service Endocrinologie, CHU Poitiers, France

<sup>9</sup>Centre de Référence Anomalies du Développement Ouest, CHU Poitiers, France

Manuscript Received: 29 December 2014; Manuscript Accepted: 5 March 2015

Disorders of Sex Development (DSD) are a heterogeneous group of disorders affecting gonad and/or genito-urinary tract development and usually the endocrine-reproductive system. A genetic diagnosis is made in only around 20% of these cases. The genetic causes of 46,XX-*SRY* negative testicular DSD as well as ovotesticular DSD are poorly defined. Duplications involving a region located ~600 kb upstream of *SOX9*, a key gene in testis development, were reported in several cases of 46,XX DSD. Recent studies have narrowed this region down to a 78 kb interval that is duplicated or deleted respectively in 46,XX or 46,XY DSD. We identified three phenotypically normal patients presenting with azoospermia and 46,XX testicular DSD. Two brothers carried a 83.8 kb duplication located ~600 kb upstream of *SOX9* that overlapped with the previously reported rearrangements. This duplication refines the minimal region associated with 46,XX-*SRY* negative DSD to a 40.7–41.9 kb element located ~600 kb upstream of *SOX9*. Predicted enhancer elements and evolutionary-conserved binding sites for proteins known to be involved in testis determination are located within this region. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** 46,XX DSD; duplication; regulatory element; *SOX9* gene; CNV

### INTRODUCTION

Disorders of sex development (DSD) are congenital conditions in which the development of chromosomal, gonadal, or anatomical

#### How to Cite this Article:

Hyon C, Chantot-Bastaraud S, Harbuz R, Bhourri R, Perrot N, Peycelon M, Sibony M, Rojo S, Piguel X, Bilan F, Gilbert-Dussardier B, Kitzis A, McElreavey K, Siffroi J-P, Bashamboo A. 2015. Refining the Regulatory Region Upstream of *SOX9* Associated With 46,XX Testicular Disorders of Sex Development (DSD). *Am J Med Genet Part A* 9999A:1–8.

sex is atypical [Hughes et al., 2006]. DSD covers a wide spectrum of

Conflict of interest: None.

Grant sponsor: Agence Nationale de la Recherche-GIS Institut des Maladies Rares; Grant sponsor: March of Dimes Foundation Research; Grant number: 1-FY07-490; Grant sponsor: EuroDSD in the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007–2013; Grant number: 201444.

\*Correspondence to:

Capucine Hyon, Service de Génétique et d'Embryologie Médicales, 26 rue du Dr Arnold Netter, 75012 Paris, France.

E-mail: capucine.hyon@trs.aphp.fr

Article first published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com); 00 Month 2015

DOI 10.1002/ajmg.a.37101

phenotypes. 46,XY DSD includes 46,XY complete or partial gonadal dysgenesis as well as undermasculinization of an XY male due to a defect in androgen synthesis or action. At the opposite, most 46,XX DSD correspond to the virilization of an XX female due to androgen excess. Most often, 46,XX testicular DSD, a rare pathology affecting 1 in 20,000–25,000 newborn males, [Kousta et al., 2010] are *SRY* positive and have Y-to-X translocations while most cases of 46,XX ovotesticular DSD are mosaics or chimeras [López et al., 1995]. However, some 46,XX males do not carry the *SRY* gene and the genetic cause of these DSD cases remains poorly defined.

Human sex determination is a tightly controlled and highly complex process where the bipotential gonad anlage develops to form either a testis or an ovary. In 46,XY males the expression of the testis determining gene *SRY* leads to the upregulation of the *SOX9* gene and the development of Sertoli cells that produce AMH and initiate the series of events that lead to testis formation. Prior to the expression of *Sry* in mice, *Sox9* expression is at basal levels in both male and female gonadal primordial cells and at 11.5 days dpc, following the expression of *Sry*, it is up-regulated in males and down-regulated in females. Upregulation in males is due, at least in part, to a synergistic action of *Sry* with NR5A1/SF1, through binding to a testis-specific *Sox9* enhancer named TESCO (Testis-specific Enhancer of *SOX9* Core), located approximately 13 kb upstream of *Sox9* [Sekido and Lovell-Badge, 2008]. In XX-*SRY* negative males duplication of the entire *SOX9* gene was described in a boy with severe penile hypospadias and XX karyotype [Huang et al., 1999]. Rearrangements involving other closely related members of the *SOX* gene family have also been associated with testis development in 46,XX individuals including the *SOX3* and *SOX10* genes [Polanco et al., 2010; Sutton et al., 2011; Moalem et al., 2012]. Mutations or deletions in *RSP01* and *WNT4*, genes involved in the *WNT4*- $\beta$  catenin pathway leading to *SOX9* downregulation, have been described in syndromic forms of 46,XX *SRY*-negative testicular DSD [Parma et al., 2006; Mandel et al., 2008].

As well as being essential for testis formation, *SOX9* plays a key role in chondrogenesis [Bell et al., 1997; Ng et al., 1997]. Consequently, mutations in the coding sequences of *SOX9* are associated with campomelic dysplasia and, in about 70% of affected 46,XY individuals, with a range of anomalies of testis development [Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994]. Translocations and copy number variation both 5' and 3' to *SOX9* gene, are associated with a milder phenotype as compared with the intragenic mutations. Large duplications (>1 Mb) 5' to *SOX9* are associated with brachydactyly-anonychia (Cooks syndrome) and deletions located >1.3 Mb 5' and 3' to *SOX9* are associated with micrognathia, cleft palate and glossoptosis (Pierre-Robin sequence) [Benko et al., 2009; Kurth et al., 2009]. In both examples there is an apparently normal testis development in 46,XY men and the precise phenotype associated with *SOX9* mutations depends on the position and size of the rearrangement. Indeed, four recent studies have reported 46,XX-*SRY* negative individuals who presented with testis development. Each carried duplications involving a chromosomal region located approximately 600 kb upstream of *SOX9* [Benko et al., 2011; Cox et al., 2011; Vetro et al., 2011; Xiao et al., 2013]. In contrast, 46,XY females with gonadal dysgenesis have been reported to carry overlapping deletions of this region [Benko et al., 2011; Bhagavath et al., 2014]. These individuals presented with no other associated

somatic anomalies, suggesting that a regulatory element involved specifically in human sex-determination (termed *RevSex*) is located in this region [Benko et al., 2011].

Here, we describe three novel 46,XX-*SRY* negative patients, two brothers and an unrelated man with testicular DSD and azoospermia, who carry a microduplication upstream of *SOX9*. The detailed analyses of these patients and the incorporation of the published datasets have enabled the minimal critical region located ~600 kb upstream of *SOX9* to be resolved to an approximately 40kb element that contains putative enhancers elements and DNA-binding sites for known factors to be involved in early testis formation.

## MATERIALS AND METHODS

### Clinical Reports

Patients 1 and 2 were two brothers referred for infertility at the age of 30 and 31 respectively. Both had normal male genitalia without any signs of undervirilization. Clinical examination in Patient 1 revealed a reduced testicular volume (10 ml; normal range 18–30 ml). Semen analysis revealed an azoospermia. Ultrasound examination of the scrotum in Patient 1 was normal and pelvic ultrasound examination showed a normal male genital tract without Mullerian remnants. Testicular biopsy was performed to rule out a possible 46,XX/46,XY chimera. It revealed atrophic seminiferous tubules containing only eosinophilic Sertoli cells suggestive of testicular dysgenesis. There was no evidence of spermatogenesis and the interstitium showed hyperplasia of Leydig cells.

Patient 3 was a 45-year-old male who was referred for clinical investigation after five years of infertility. He presented with a normal male phenotype and had a normal libido and no erectile dysfunction. Ultrasound investigation showed bilaterally hypotrophic testes (right 15 mm  $\times$  7 mm and left 18 mm  $\times$  12 mm) with calcifications, seminal vesicle hypoplasia and normal prostate. Semen analysis showed azoospermia.

### Genetic Analysis

Genetic analyses were performed after obtaining patient's informed consent. Cytogenetic analysis was performed using GTG-banding techniques on metaphase chromosomes obtained by standard procedures from peripheral blood lymphocytes. FISH analysis was carried out using chromosome X specific probe DXZ1 and probes for *SRY* and *SOX9* locus.

Genomic DNA was extracted for each patient from peripheral blood samples using FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to manufacturer's instructions.

For patients 1, 2 and 3, SNP array analysis was performed using the HumanCytoSNP-12 BeadChip from Illumina (San Diego, CA). Data analysis was performed using Illumina's Genome Studio Genotyping Module software allowing the identification of both copy number variations (CNVs) with the Log R ration (LRR) and regions of copy-neutral loss of heterozygosity (LOH) with the B allele frequency. Previous array CGH for patient 3 was performed using the Human Genome CGH Microarray Kit 105A from Agilent (Santa Clara,

CA). DNA sequence information was made according to the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>; February 2009, Assembly, hg19).

Boundaries of the duplication for Patient 2 were confirmed by long-range PCR using primers in the 5' and 3' parts of the putative duplicated region (Supplemental data). The long-range PCR amplicon was generated using Roche's Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics, Meylan, France) according to the following conditions: 5  $\mu$ l of 10 $\times$  Expand Long Template Buffer 3 (including 27.5 mM MgCl<sub>2</sub> and detergents), 8.75  $\mu$ l of a 2  $\mu$ mol/L of dNTPs, 0.75  $\mu$ l of Expand Long Template Enzyme Mix, 3  $\mu$ l of a 5  $\mu$ mol/L of each primer, 150 ng of genomic DNA, 26.5  $\mu$ l of water in a total reaction volume to 50  $\mu$ l. Reaction was cycled under following conditions: 94  $^{\circ}$ C for 2 min; 94  $^{\circ}$ C for 10 sec; annealing temperature of 60  $^{\circ}$ C for 30 sec; 68  $^{\circ}$ C for 10 min; cycle 10 $\times$  from step 2; 94  $^{\circ}$ C for 15 sec; annealing temperature of 60  $^{\circ}$ C for 30 sec; 68  $^{\circ}$ C for 10 min plus 20 sec per cycle; cycle 30 $\times$  from step 5; 68  $^{\circ}$ C for 7 min; and hold at 4  $^{\circ}$ C. Internal primers were used to sequence the amplicon. Data were analyzed using SeqScape<sup>®</sup> Software v2.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems).

### Quantitative PCR

For the qPCR analysis, genomic DNA from the Patients 1 and 2 and two other individuals with two copies of the region (as indicated by the array analysis) were evaluated for quantity and quality via an ND-8000 Spectrophotometer (NanoDrop<sup>®</sup>) and agarose gel electrophoresis. Only intact genomic DNA was used for qPCR analysis. Six sets of Taqman<sup>®</sup> CNV assays were custom designed, each at approximately 9 kb interval, to span the entire duplication (Supplemental data, Table S1).

Each DNA sample was analyzed in triplicate and reactions were conducted in a MicroAmp fast 96-well optical reaction plate (P/N 4346906; Applied Biosystems) sealed with an optical adhesive cover (P/N 4311971; Applied Biosystems) on 7900HT System (96-Well Block) real-time PCR System. Each individual reaction contained CNV assay (containing two primers and a FAM<sup>™</sup> dye labeled MGB probe), RNaseP assay (containing two primers and a VIC<sup>®</sup> dye-labeled TAMRA<sup>™</sup> probe), TaqMan<sup>®</sup> Genotyping Master Mix (containing AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNAPolymerase, and dNTPs), 15 ng genomic DNA and water to a final reaction volume to 20  $\mu$ l. Reactions were held at 95  $^{\circ}$ C for 10 min and then cycled 40 times through 95  $^{\circ}$ C for 15 sec and 60  $^{\circ}$ C for 1 min. The data was collected using Sequence Detection Software v2.3 (Applied Biosystems). qPCR data was analyzed using a delta delta Ct algorithm with RnaseP as an endogenous control. Calibration with a control sample with two copies of the region was used to calculate delta delta Ct values and assign copy numbers by CopyCaller<sup>®</sup> software.

### RESULTS

For all the patients initial cytogenetic standard G-banding analysis (550 bands) showed an homogenous 46,XX karyotype. FISH studies with both the *DXZ1* and *SRY* probes confirmed the existence of two X chromosomes and the absence of the *SRY* gene in all cells analyzed (Supplemental data, Figure S1). Hybridization with the *SOX9* probe was normal for Patients 1 and 2 (not performed for Patient 3) (Supplemental data, Figure S1).

In Patient 1 and 2, SNP array analysis identified a 77,078 to 85,175 bp duplication in chromosome 17 long arm, upstream from *SOX9* gene, extending between 69,490,856 (normal)–69,493,863 (duplicated) and 69,570,941 (duplicated)–69,576,031 (normal) (Fig. 1). For Patient 3, array CGH identified an overlapping

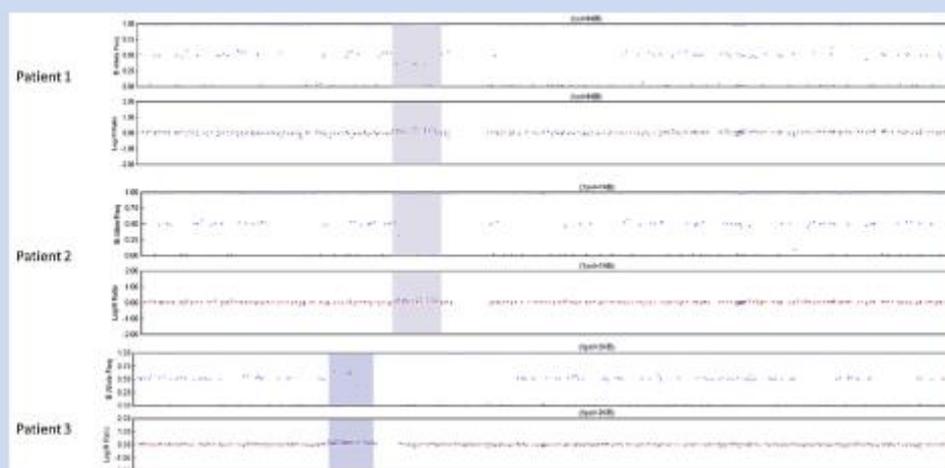


FIG. 1. SNP array results for Patients 1, 2 and 3 of the duplicated region. Note the increase in the log R Ratio within the duplicated region [grey box] [Scales: for Patients 1 and 2: 1 pixel = 1 kb, Patient 3: 1 pixel = 2 kb]

duplication of 194 kb in the same region which was reduced to 140,572–152,536 bp between 69,435,809 (normal)–69,441,277 (duplicated) and 69,581,849 (duplicated)–69,588,345 (normal) using the SNP array (Fig. 1). These duplications were confirmed by independent qPCR analysis for Patients 1 and 2 (data not shown) and sequencing the boundaries of the duplication for Patient 2 which allowed us to identify the exact size of the duplication extending between 69,491,366 and 69,575,195 (83,829 bp duplication) (Fig. 2).

Xiao et al, described an XX male with a 74 kb duplication overlapping with this region which proximal breakpoint was located between 69,533,305 bp (normal) and 69,534,526 bp (duplicated) [Xiao et al., 2013]. Taking this data and our breakpoint into account we can redefine the minimal region duplicated to a minimum size of 40,669 bp and a maximum size of 41,890 bp (Supplementary Figure S2). Detailed analysis of this region indicates that it contains two non-overlapping putative enhancer elements. The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) project datasets indicate a weak or poised enhancer at chr17:69,568,380–69,569,850. Chromatin at this position is enriched for experimentally determined CTCF-binding from human mammary epithelial cells (HMEC). The primary role of CTCF is thought to be in regulating the 3D structure of chromatin. CTCF creates boundaries between topologically-associating domains in chromosomes and anchors DNA to cellular structures like the nuclear lamina and thereby facilitates interactions between transcription regulatory sequences [Murrell, 2011]. This region is also associated with acetylation of histone H3 at lysine 27 (H3K27ac) and enriched in monomethylation of histone H3 at lysine 4 (H3K4me1) from a variety of cell lines (Supplementary Figure S2). Both H3K4 methylation and H3K27 acetylation are epigenetic marks that are generally associated with gene activation [Eissenberg and Shilatfard, 2010; Smith and Shilatfard, 2014].

A strong putative enhancer element is located at chr17:69,544,206–69,546,005 and it is associated with H3K27Ac and H3K4me1

enrichment, as well as the repressive mark H3K9me3 which was identified experimentally by ChIP-seq. The histone acetyltransferase EP300, which is a known co-activator of *SOX9*-dependent gene expression, binds to this element (chr17:69,544,741–69,545,056) [Furumatsu et al., 2009]. This was determined experimentally using neuroblastoma cell line treated with retinoic acid (SK-N-SH\_RA).

Multiz alignment results obtained from the UCSC genome browser show 12 short evolutionary-conserved regions that are enriched for transcription factors binding sites that are present in the human, mouse and rat (Supplementary Figure S2). These include factors that are strongly expressed in the male supporting cell lineages of the mouse testis at the time of sex-determination (E11.5–E13.5) and include NFIL3 (also known as E4BP4; chr17:69,544,862–69,544,873), PBX1 (chr17:69,563,419–69,563,427) and GATA1 (chr17:69,560,189–69,560,198 and chr17:69,560,189–69,560,198). In addition, to these factors TRANSFAC and TFSEARCH analysis of the human sequence predicted multiple DNA-binding sites for transcription factors known to be involved in the early stages of sex-determination such as SRY, WT1, *SOX9*, NR5A1, and LHX9 [Bashamboo and McElreavey, 2013]. The region also contains four predicted binding sites for the evolutionary conserved transcription factor DMRT1 at chr17:69,543,454–69,543,468, chr17:69,554,542–69,554,559, chr17:69,559,047–69,559,062, and chr17:69,569,634–69,569,648.

## DISCUSSION

Multiple tissue specific enhancers located upstream and downstream from *SOX9* have been described [Velagaleti et al., 2005; Bagheri-Fam et al., 2006; Gordon et al., 2009]. In the human, a large duplication (46,XX,dup(17)(q23.1q24.3)/46,XX) involving *SOX9* was associated with female to male sex reversal in a 46,XX individual [Huang et al., 1999], however mutations or translocations involving the *TESCO* region have not yet been reported [Georg et al., 2010]. This suggests that in human gonad additional

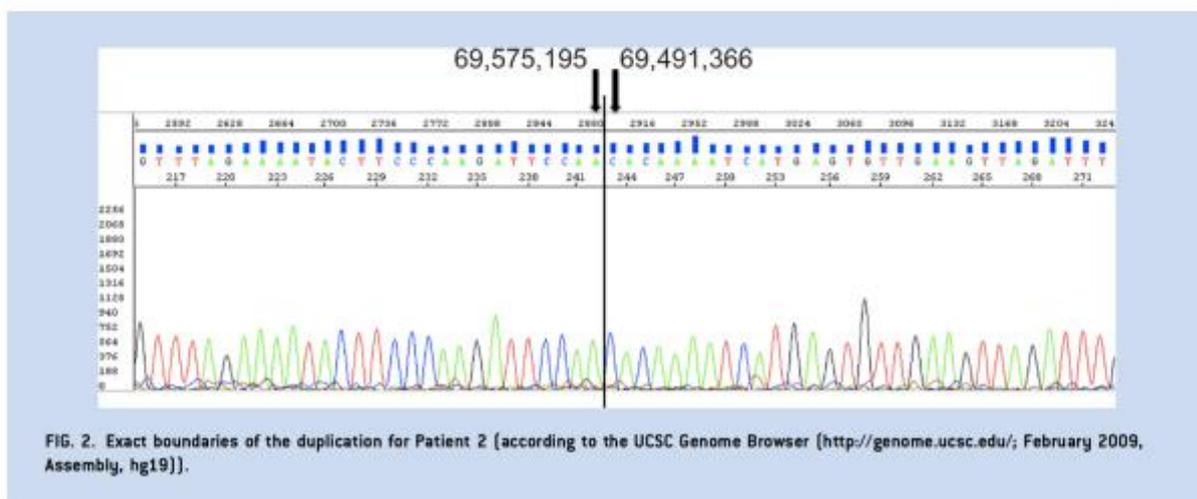


FIG. 2. Exact boundaries of the duplication for Patient 2 (according to the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>; February 2009, Assembly, hg19)).

TABLE 1. Phenotypic Features and Characteristics of the Rearrangement of Individuals With Rearrangement Upstream of SOX9

	Benko et al. (2011)				Dhagevath et al. (2014)		Our patients				
	Cox et al. (2011)	Vetro et al. (2011)	DS01	DS02	DS03	DS04 Case 1	DS04 Case 2	Xiao et al. (2013)	Case III3	Patients 1 & 2	Patient 3
Karyotype	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX	46,XX	46,XY	46,XY	45,XX	46,XY	46,XX	45,XX
SPY	—	—	—	—	—	—	NA	—	+	—	—
Phenotype	Male	Male	—	Perineal hypospadias	Perineal hypospadias	Perineal hypospadias	Urogenital sinus Phallus	Female	Female	Male	Male
Internal genitalia	NA	—	Hypospadias	—	Incurved penis	Asymmetric scrotum	Asymmetric scrotum	—	Left adnexal mass	Hypotrophic testes	Hypotrophic testes
		Hypotrophic testes	Incurved short penis	Right : testis	Right : streak gonad partially differentiated toward ovary	Vagina, uterus	Right : normal testis	Right : streak gonad with gonadoblastoma	Small uterus	No müllerian remnants	NA
		NA	Blind scrotum	Left : ovarian remnant with fallopian tube structures	Left : ootestis, epididymal structure and fallopian tube	—	Left : streak gonad, fallopian tube, hemi-uterus	Left : ovary	Left adnexal mass	—	NA
		NA	Epididymal structures	Dvotestes	—	—	—	—	Right streak gonad	—	NA
Sex of rearing	Male	Male	Male	Male	Female	Female	Female	Male	Female	Male	Male
Gonadal histology	Sertoli and Leydig cells	Germinal cell aplasia	NA	Right : dispersed primordial oocytes and rare follicles	Right : dispersed primordial oocytes and rare follicles	Right : dispersed primordial oocytes and rare follicles	Right : small testis and normal architecture with spermatogonia in seminiferous tubules	NA	Sreak gonad	Eosinophilic Sertoli cells	NA
	Atrophied seminiferous tubules	—	—	Left : Testicular portion : numerous seminiferous tubules and Sertoli cells; (ovarian portion : abundant	Left : Testicular portion : numerous seminiferous tubules and Sertoli cells; (ovarian portion : abundant	Left : Testicular portion : numerous seminiferous tubules and Sertoli cells; (ovarian portion : abundant	Left : streak gonad	—	—	—	Atrophy of seminiferous tubules
	No spermatogenesis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Leydig cells hyperplasia

(Continued)



by antagonizing the ovarian gene regulatory pathway [Ottolenghi and McElreavey, 2000; Matson et al., 2011]. In avians, where *DMRT1* is the best candidate testis-determining gene, it is necessary for the expression of *SOX9* [Smith et al., 2009; Lambeth et al., 2014]. ChIPseq experiments using mice using cells from P28 testis have demonstrated that *Dmrt1* binds to both upstream and downstream of *Sox9* and bind near to the genes *Wnt4*, *Foxl2*, and *Rspo1* suggesting that *DMRT1* may initiate or maintain male cell fate by directly activating *Sox9*, whilst repressing female-promoting genes [Murphy et al., 2010; Matson et al., 2011]. The localization of *DMRT1*-binding sites within a putative enhancer element within the *RevSex* element opens the possibility that the testis formations associated with these duplications could be initiated through *DMRT1* activation.

Evolutionary conserved predicted DNA-binding sites for other proteins involved in sex-determination are located in the minimal region including *PBX1*. *PBX1*, encodes a TALE (three amino acid loop extension) class homeodomain protein that participates in multimeric transcriptional complexes to modulate gene expression [Longobardi et al., 2014]. A role for *PBX1* in gonad development is highlighted by *Pbx1*-deficient mice which exhibit embryonic lethality at E15 and have severe adrenal hypoplasia together with pancreatic dysfunction, skeletal abnormalities and impaired gonadal development [Schnabel et al., 2003].

Narrowing the region encompassing gonad specific regulatory elements of *SOX9* gene to an approximately 40 kb interval containing evolutionarily conserved elements is of potential interest for further studies to delineate precisely the sequences and mechanism(s) by which this region may regulate the expression of *SOX9* during human testicular development. As hypothesized by Lybaek and colleagues, the *RevSex* element may interact with other known regulatory elements of *SOX9* such as the *TESCO* motif or the minimal promoter region of *SOX9*. In a study of a familial case of XX sex-reversal carrying a 148 kb *RevSex* duplication, the chromatin landscape at the *TESCO* enhancer element was found to be modified in cells from XX masculinized individuals [Lybaek et al., 2014]. The authors speculate that the *RevSex* duplication was acting to induce long-range epigenetic changes including a more open chromatin landscape at the *TESCO* element resulting in the upregulation of *SOX9* expression. The analyses of further DSD patients with duplications or deletions of this region should delimit further the minimal region involved and provide insights into the mechanism of sex-reversal. Moreover, the description of two novel duplications of this region, in two different families, suggests that it is likely to be a recurrent genetic cause of 46,XX-*SRY* negative males in humans although the exact mechanism of duplications/deletions remains to be elucidated.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Joelle Bignon-Topalovic for technical assistance. Support for this work was provided by the Agence Nationale de la Recherche-GIS Institut des Maladies Rares (K.M.), March of Dimes Foundation Research Grant 1-FY07-490 (K.M.), and EuroDSD in the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007–2013 under Grant 201444 (K.M. and A.B.).

## REFERENCES

- Bagheri-Fam S, Barrionuevo F, Dohrmann U, Günther T, Schüle R, Kemler R, Mallo M, Kanzler B, Scherer G. 2006. Long-range upstream and downstream enhancers control distinct subsets of the complex spatiotemporal *Sox9* expression pattern. *Dev Biol* 291: 382–397.
- Bashamboo A, McElreavey K. 2013. Gene mutations associated with anomalies of human gonad formation. *Sex Dev* 7:126–146.
- Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS. 1997. *SOX9* directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* 16:174–178.
- Benko S, Fantes JA, Amiel J, Kleinjan D-J, Thomas S, Ramsay J, Jamshidi N, Essafi A, Heaney S, Gordon CT, McBride D, Golzio C, Fisher M, Perry P, Abadie V, Ayuso C, Holder-Espinasse M, Kilpatrick N, Lees MM, Picard A, Temple IK, Thomas P, Vazquez M-P, Vekemans M, Crollius HR, Hastie ND, Munnich A, Etchevers HC, Pelet A, Farlie PG, FitzPatrick DR, Lyonnet S. 2009. Highly conserved non-coding elements on either side of *SOX9* associated with Pierre Robin sequence. *Nat Genet* 41:359–364.
- Benko S, Gordon CT, Mallet D, Sreenivasan R, Thauvin-Robinet C, Brendehaug A, Thomas S, Bruland O, David M, Nicolino M, Labalme A, Sanlaville D, Callier P, Malan V, Huet F, Molven A, Dijoud F, Munnich A, Faivre L, Amiel J, Harley V, Houge G, Morel Y, Lyonnet S. 2011. Disruption of a long distance regulatory region upstream of *SOX9* in isolated disorders of sex development. *J Med Genet* 48: 825–830.
- Bhagavath B, Layman LC, Ullmann R, Shen Y, Ha K, Rehman K, Looney S, McDonough PG, Kim H-G, Carr BR. 2014. Familial 46,XY sex reversal without campomelic dysplasia caused by a deletion upstream of the *SOX9* gene. *Mol Cell Endocrinol* 393:1–7.
- Cox JJ, Willatt L, Homfray T, Woods CG. 2011. A *SOX9* duplication and familial 46, XX developmental testicular disorder. *N Engl J Med* 364: 91–93.
- Eissenberg JC, Shilatfard A. 2010. Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Dev Biol* 339:240–249.
- El-Khairi R, Achermann JC. 2012. Steroidogenic factor-1 and human disease. *Semin Reprod Med* 30:374–381.
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an *SRY*-related gene. *Nature* 372:525–530.
- Furumatsu T, Ozaki T, Asahara H. 2009. Smad3 activates the *Sox9*-dependent transcription on chromatin. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1198–1204.
- Georg I, Bagheri-Fam S, Knower KC, Wieacker P, Scherer G, Harley VR. 2010. Mutations of the *SRY*-responsive enhancer of *SOX9* are uncommon in XY gonadal dysgenesis. *Sex Dev* 4:321–325.
- Gordon CT, Tan TY, Benko S, Fitzpatrick D, Lyonnet S, Farlie PG. 2009. Long-range regulation at the *SOX9* locus in development and disease. *J Med Genet* 46:649–656.
- Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. 1999. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of *SOX9*. *Am J Med Genet* 87: 349–353.
- Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA. 2006. Consensus statement on management of intersex disorders. *J Pediatr Urol* 2:148–162.
- Ito M, Yu RN, Jameson JL. 1998. Steroidogenic factor-1 contains a carboxy-terminal transcriptional activation domain that interacts with steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol* 12:290–301.

- Kousta E, Papatasiou A, Skordis N. 2010. Sex determination and disorders of sex development according to the revised nomenclature and classification in 46, XX individuals. *Horm Athens Greece* 9: 218–131.
- Kurth I, Klopocki E, Stricker S, van Oosterwijk J, Vanek S, Altmann J, Santos HG, van Harssel JTT, de Ravel T, Wilkie AOM, Gal A, Mundlos S. 2009. Duplications of noncoding elements 5' of *SOX9* are associated with brachydactyly-anonychia. *Nat Genet* 41:862–863.
- Lambeth LS, Raymond CS, Roeszler KN, Kuroiwa A, Nakata T, Zarkower D, Smith CA. 2014. Over-expression of *DMRT1* induces the male pathway in embryonic chicken gonads. *Dev Biol* 389:160–172.
- Longobardi E, Penkov D, Mateos D, De Florian G, Torres M, Blasi F. 2014. Biochemistry of the tale transcription factors *PREP*, *MEIS*, and *PBX* in vertebrates. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 243:59–75.
- López M, Torres L, Méndez JP, Cervantes A, Pérez-Palacios G, Erickson RP, Alfaro G, Kofman-Alfaro S. 1995. Clinical traits and molecular findings in 46, XX males. *Clin Genet* 48:29–34.
- Lybæk H, de Bruijn D, den Engelsman-van Dijk AHA, Vanichkina D, Nepal C, Brendehaug A, Houge G. 2014. *RevSex* duplication-induced and sex-related differences in the *SOX9* regulatory region chromatin landscape in human fibroblasts. *Epigenetics Off. J DNA Methylation Soc* 9:416–427.
- Mandel H, Shemer R, Borochoowitz ZU, Okopnik M, Knopf C, Indelman M, Drugan A, Tiosano D, Gershoni-Baruch R, Choder M, Sprecher E. 2008. *SERKAL* syndrome: An autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in *WNT4*. *Am J Hum Genet* 82:39–47.
- Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D. 2011. *DMRT1* prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* 476:101–104.
- Matson CK, Zarkower D. 2012. Sex and the singular DM domain: Insights into sexual regulation, evolution and plasticity. *Nat Rev Genet* 13: 163–174.
- Moalem S, Babul-Hirji R, Stavropoulos DJ, Wherrett D, Bağli DJ, Thomas P, Chitayat D. 2012. XX male sex reversal with genital abnormalities associated with a de novo *SOX3* gene duplication. *Am J Med Genet A* 158A:1759–1764.
- Munger SC, Natarajan A, Looger LL, Ohler U, Capel B. 2013. Fine time course expression analysis identifies cascades of activation and repression and maps a putative regulator of mammalian sex determination. *PLoS Genet* 9:e1003630.
- Murphy MW, Sarver AL, Rice D, Hatzl K, Ye K, Melnick A, Heckert LL, Zarkower D, Bardwell VJ. 2010. Genome-wide analysis of DNA binding and transcriptional regulation by the mammalian *Doublesex* homolog *DMRT1* in the juvenile testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:13360–13365.
- Murrell A. 2011. Setting up and maintaining differential insulators and boundaries for genomic imprinting. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell* 89:469–478.
- Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP, Cheah KS, Koopman P. 1997. *SOX9* binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* 183:108–121.
- Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87:953–959.
- Ottolenghi C, McElreavey K. 2000. Deletions of 9p and the quest for a conserved mechanism of sex determination. *Mol Genet Metab* 71: 397–404.
- Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A, Camerino G. 2006. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 38: 1304–1309.
- Polanco JC, Wilhelm D, Davidson T-L, Knight D, Koopman P. 2010. *Sox10* gain-of-function causes XX sex reversal in mice: Implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Hum Mol Genet* 19:506–516.
- Schnabel CA, Selleri L, Cleary ML. 2003. *Pbx1* is essential for adrenal development and urogenital differentiation. *Genes NYN* 37: 123–130.
- Sekido R, Lovell-Badge R. 2008. Sex determination involves synergistic action of *SRY* and *SF1* on a specific *Sox9* enhancer. *Nature* 453:930–934.
- Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ, Sinclair AH. 2009. The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461:267–271.
- Smith E, Shilatfard A. 2014. Enhancer biology and enhanceropathies. *Nat Struct Mol Biol* 21:210–219.
- Sutton E, Hughes J, White S, Sekido R, Tan J, Arboleda V, Rogers N, Knowler K, Rowley L, Eyre H, Rizzotti K, McAninch D, Goncalves J, Slee J, Turbitt E, Bruno D, Bengtsson H, Harley V, Vilain E, Sinclair A, Lovell-Badge R, Thomas P. 2011. Identification of *SOX3* as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J Clin Invest* 121: 328–341.
- Velagaleti GVN, Bien-Willner GA, Northrup JK, Lockhart IH, Hawkins JC, Jalal SM, Withers M, Lupski JR, Stankiewicz P. 2005. Position effects due to chromosome breakpoints that map approximately 900 Kb upstream and approximately 1.3 Mb downstream of *SOX9* in two patients with campomelic dysplasia. *Am J Hum Genet* 76:652–662.
- Vetro A, Ciccone R, Giorda R, Patricelli MG, Della Mina E, Forlino A, Zuffardi O. 2011. XX males *SRY* negative: A confirmed cause of infertility. *J Med Genet* 48:710–712.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the *SRY*-related gene *S OX9*. *Cell* 79:1111–1120.
- Xiao B, Ji X, Xing Y, Chen Y-W, Tao J. 2013. A rare case of 46, XX *SRY*-negative male with a ~74 kb duplication in a region upstream of *S OX9*. *Eur J Med Genet* 56:695–698.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

**Article 2 : Deletion of CPEB1 Gene: A Rare but Recurrent  
Cause of Premature Ovarian Insufficiency**



## Deletion of *CPEB1* Gene: A Rare but Recurrent Cause of Premature Ovarian Insufficiency

C. Hyon, L. Mansour-Hendili, S. Chantot-Bastarud, B. Donadille, V. Kerlan, C. Dodé, S. Jonard, B. Delemer, A. Gompel, Y. Reznik, P. Touraine, J. P. Siffroi, and S. Christin-Maitre\*

**Context:** Premature ovarian insufficiency (POI) may be secondary to chemotherapy, radiotherapy, or environmental factors. Genetic causes are identified in 20–25% of cases, but most POI cases remain idiopathic.

**Objective:** This study aimed to identify new genes involved in POI and to characterize the implication of *CPEB1* gene in POI.

**Design and Setting:** This was a case report and cohort study replicate conducted in academic medical centers.

**Patients and Methods:** A deletion including *CPEB1* gene was first identified in a patient with primary amenorrhea. Secondly, 191 sporadic POI cases and 68 familial POI cases were included. For each patient, karyotype was normal and *FMR1* premutation was excluded. Search for *CPEB1* deletions was performed by quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments or DNA microarray analysis. Gene sequencing of *CPEB1* was performed for 95 patients.

**Results:** We identified three patients carrying a microdeletion in band 15q25.2. The proximal breakpoint, for the three patients, falls within a low-copy repeat region disrupting the *CPEB1* gene, which represents a strong candidate gene for POI as it is known to be implicated in oocyte meiosis. No mutation was identified by sequencing *CPEB1* gene. Therefore, heterozygous deletion of *CPEB1* gene leading to haploinsufficiency could be responsible for POI in humans.

**Conclusion:** Microdeletions of *CPEB1* were identified in 1.3% of patients with POI, whereas no mutation was identified. This microdeletion is rare but recurrent as it is mediated by nonallelic homologous recombination due to the existence of low-copy repeats in the region. This result demonstrates the importance of DNA microarray analysis in etiological evaluation and counseling of patients with POI. (*J Clin Endocrinol Metab* 101: 2099–2104, 2016)

Premature ovarian insufficiency (POI), clinically characterized by the early loss of normal ovarian function before the age of 40 years, occurs in approximately 1–5% of women (1). Familial history is reported in 10–15% of cases, suggesting a genetic cause in some POI. Indeed, genetic causes have been described so far in approximately 20–25% of patients with POI (2). They include isolated POI as well as syndromic POI, such as Turner syndrome (monosomy X), blepharophimosis syndrome, galac-

tosemia, and autoimmune polyendocrinopathy. The main genetic causes identified are chromosomal abnormalities (Turner syndrome, Xq deletions, X;autosome translocations) and gene mutations (*FMR1*, *FOXL2*, *BMP15*, *GDF9*, *NOBOX*, *NR5A1*. . . ) (3–8).

POI may also be related to ovarian surgery, mainly for bilateral endometriomas (9), to ovarian toxicity induced by chemotherapy and/or radiotherapy (10) and to environmental factors (11, 12). However, most POI cases remain idiopathic.

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197  
Printed in USA  
Copyright © 2016 by the Endocrine Society  
Received February 2, 2016. Accepted March 14, 2016.  
First Published Online March 22, 2016

\* Author Affiliations are shown at the bottom of the next page.  
Abbreviations: BAC, bacterial artificial chromosome; CGH, comparative genomic hybridization; CNV, copy number variation; *CPEB1*, cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1; DGV, Database of Genomic Variants; FISH, fluorescence in situ hybridization; LCR, low-copy repeat; NAHR, nonallelic homologous recombination; POI, premature ovarian insufficiency; QMPSF, quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments; SNP, single-nucleotide polymorphism.

We describe a rare but recurrent deletion of the 15q25.2 chromosomal region that was identified in three independent patients among 260 women with POI. This region includes the cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1 (*CPEB1*) gene, which strongly seems to be responsible for ovarian failure when deleted.

## Materials and Methods

### Population study

A first patient was referred for genetic analysis because of a primary amenorrhea associated with behavioral disorders and progressive intellectual deficiency. By using array comparative genomic hybridization (CGH), this patient (Patient 1) was shown to carry a deletion in 15q25.2 including the *CPEB1* gene.

Several patients with POI have been further tested, including 191 sporadic cases recruited in St. Antoine hospital, as well as 68 familial cases from 37 pedigrees. All patients included in our study had a 46, XX karyotype and *FMR1* premutation was excluded. All patients signed an informed consent form. The study was approved by local ethics committee.

Therefore, *CPEB1* was sequenced in 95/191 sporadic patients with POI to search for deleterious mutations. No *CPEB1* sequence variation was found in these patients but 26 of them were shown to be homozygous or presented no variations for all polymorphisms found in the coding sequence. This suggested that the second allele of *CPEB1* gene could be deleted. Therefore, they were tested for *CPEB1* deletion using the quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments (QMPSF) technique. A second deletion (Patient 2) was found. These results led to the screening by QMPSF of a second cohort of 96/191 new sporadic patients with POI. No deletion was identified in this cohort of patients.

Meanwhile, we studied 68 familial POI cases by using single-nucleotide polymorphism (SNP) array. This study led to the diagnosis of a third 15q25.2 deletion (Patient 3).

To eliminate other genetic causes of POI, the mother and the sister of the familial case were recruited. They were screened, as well as the three deleted cases, for mutations in 23 genes known to be involved in POI.

### Genetic analysis

#### Copy number variation analysis

For the index patient (Patient 1), molecular karyotyping was performed using the array-CGH oligonucleotide platforms Agilent Human Genome CGH Microarray Kit 180K (Agilent Technologies). This high-resolution 60-mer oligonucleotide-based microarray contains approximately 170,000 probes spanning

coding and noncoding genomic sequences with a theoretical median spacing of 13 kb. Array was analyzed using the Agilent scanner (G2656BA). Patient CGH files extracted from Feature Extraction (Agilent Technologies) were uploaded into the Nexus Copy Number software v5.1 (Biodiscovery, Inc.). A loop design model was used: patient's trio hybridization strategy. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis, according to standard protocols, was carried out using a bacterial artificial chromosome (BAC) probe, RP11-90B9 at *HOMER2* locus on 15q25.2.

SNP array analysis was performed using the Human Omni-Express BeadChip from Illumina in 37 families representing 68 patients from the FAMIOP program. Data analysis was performed using Illumina's Genome Studio Genotyping Module software allowing the identification of both copy number variations (CNVs) with the Log R ratio and regions of copy-neutral loss of heterozygosity with the B allele frequency. DNA sequence information was made according to the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>; February 2009, Assembly, hg19). As controls, CNVs found in our study were compared with those reported in the Database of Genomic Variants (DGV), which reports copy number variations in healthy people (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>).

For the QMPSF technique, a five-fragments multiplex PCR assay was performed to obtain PCR products specific for exons 3, 4, and 12 of *CPEB1* gene, for a 234-bp fragment, targeting the *GFAP* housekeeping gene as normalization control, and for a 354-bp fragment targeting the *DMD* gene on chromosome X as an internal control, as described by Yau et al (13). All forward primers in the assay were 5' labeled with the fluorescent phosphoramidite 6-FAM (MWG Biotech). Three DNA controls (one female, one male, and one positive control known to have a heterozygous *CPEB1* deletion identified by DNA microarray) were run in each assay. After 22 cycles of PCR amplification, samples were denatured and loaded on an ABI 3730XL sequencer (Applied Biosystems) for fragment analysis. Fluorescent signals were identified using Gene Mapper Software (Applied Biosystems). To determine gene dosage for every amplified region in the assay, dosage quotients were obtained by dividing the ratio (target peak area/*GFAP* peak area) from a sample by the corresponding ratio from the female DNA control. This equation gives a theoretical dosage quotient value of 1.0 for two copies and a value of 0.5 for deletions.

### Sequence analysis

The coding regions and the flanking intronic regions of different isoforms of the *CPEB1* gene were amplified and sequenced (NM\_030594, NM\_001079533, NM\_001079534, NM\_001079535) according to standard procedures (primer sequences available upon request). Sanger sequencing was performed using ABI prism BigDye Terminator v3.1 Cycle

Département de Génétique Médicale (C.H., L.M.H., S.C.B., J.P.S.), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Groupe Hospitalier Universitaire de l'Est Parisien-Hôpital Armand Trousseau, 75012, Paris, France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMRS 933, Physiopathologie des Maladies Génétiques d'Expression Pédiatrique (C.H., J.P.S., S.C.M.), Hôpital Armand Trousseau, 75012 Paris, France; Unité de Formation et de Recherche (UFR) de Médecine Pierre et Marie Curie, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Université Paris VI (C.H., J.P.S., S.C.M.), Paris, France; Service d'Endocrinologie et Médecine de la Reproduction-CRMERC (B.D., S.C.M.), AP-HP, Groupe Hospitalier Universitaire de l'Est Parisien-Hôpital St-Antoine, 75012 Paris, France; Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Maladies Métaboliques (V.K.), Centre Hospitalier Universitaire de Brest, La Cavale Blanche, 29200, Brest, France; Département de Génétique et Développement (C.D.), Institut Cochin, INSERM U1016, Université Paris-Descartes, Paris, France; Service de Gynécologie Endocrinienne et Médecine de la Reproduction (S.J.), Hôpital Jeanne-de-Flandre, 59037 Lille, France; Service d'Endocrinologie-Diabète-Nutrition (B.D.), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Reims-Hôpital Robert-Debré, 51092 Reims, France; Unité de Gynécologie Endocrinienne (A.G.), Université Paris Descartes, Hôpital Port Royal, Paris, France; Service d'Endocrinologie (Y.R.), Centre Hospitalier Universitaire Côte de Nacre, 14000 Caen, France; and Service Endocrinologie et Médecine de la Reproduction-CRMERC (P.T.), AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 75013, Paris, France.

sequencing Kit (Applied Biosystems) on an ABI 3730XL automated sequencer (Applied Biosystem).

In patients carrying a 15q25.2 deletion and in two family members, 23 genes implicated in POI were screened for mutations using Next Generation Sequencing. Mutations were sought in the coding exons and flanking splice sites of *BHLHB9* (NM\_001142524), *BMP15* (NM\_005448), *DMC1* (NM\_007068), *EIF2S2* (NM\_003908), *ESR1* (NM\_001122742), *FIGLA* (NM\_001004311), *FOXL2* (NM\_023067), *FSHB* (NM\_000510), *FSHR* (NM\_181446), *LHX8* (NM\_001001933), *GDF9* (NM\_05260), *GPR3* (NM\_005281), *INHA* (NM\_002191), *INHBA* (NM\_002192), *INHBB* (NM\_002193), *LHB* (NM\_000894), *LHCGR* (NM\_000233), *MSH5* (NM\_172166), *NOBOX* (NM\_001080413), *NR5A1* (NM\_004959), *PGRMC1* (NM\_006667), *STAG3* (NM\_012447), *HFM1* (NM\_001017975). Primer design was performed using the Ampliseq designer software. Library preparation was carried out using the Ion Plus Fragment Library Kit, with 50 ng of amplicons. Adapter ligation, nick repair, and amplification were performed according to the Ion Torrent protocol (Life Technologies). Emulsion PCR and enrichment steps were carried out using the Ion One Touch Template kit. Sequencing of the amplicon libraries was carried out on the Ion Torrent PGM system using 316 chips and barcoding with Ion Xpress barcode adapters kit. The Ion Sequencing Kit was used for all sequencing reactions, according to the recommended protocol. After sequencing, reads were mapped to human genome 19 (hg19) using Torrent Mapping Alignment Program. Single nucleotide variations and small insertions/deletions (indels) were identified using the Torrent Variable Caller (Life Tech-

nologies) and Nextgene software. All the mutations found by the Next Generation Sequencing technique were confirmed by Sanger sequencing.

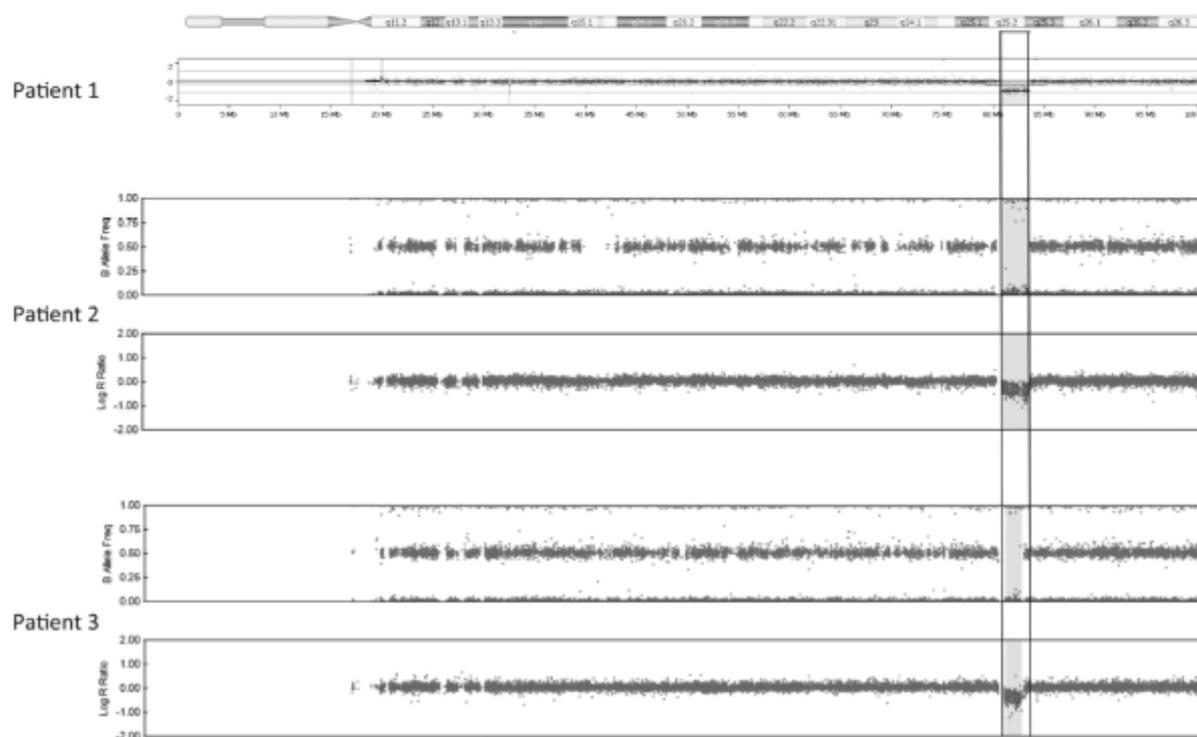
## Results

Our study revealed copy number variations (CNVs) in three independent patients with POI, each of them located in the same 15q25.2 chromosomal region, containing the *CPEB1* gene (Figure 1). *CPEB1* sequencing did not reveal any mutation.

Clinical data of our three patients are reported in Table 1. Patient 3 is a familial case of POI, given that her sister had POI at the age of 39 years. Her mother delivered her last child at the age of 45 years and her menopause occurred at the age of 52 years.

### Patient 1

Array-CGH showed a heterozygous microdeletion on chromosome 15 of approximately 2.5 Mb extending from chromosomal base position 83214012 to 85728844 (hg19). This region contains 26 genes including the *CPEB1* gene, which is disrupted by the centromeric chromosomal breakpoint. FISH (fluorescent in situ hybridization) using BAC probe, RP11-90B9 at *HOMER2* locus on



**Figure 1.** DNA microarray profiles of patients 1, 2, and 3. Patient 1: profile of Agilent array CGH showing a Log ratio of  $-1$ , indicating a deletion. Patients 2 and 3: Profiles of Illumina SNP array with the log R ratio (bottom) at  $-1$  and the B allele frequency (up) showing a loss of heterozygosity in the 15q25.2 region. Deleted regions are indicated in gray.

**Table 1.** Clinical Data of the Three Patients Carrying a 15q25.2 Microdeletion

Characteristic	Patient 1	Patient 2	Patient 3
First menses	Primary amenorrhea	19	Primary amenorrhea
Cycle length	NA	60–90 d	NA
Age of POI, y	16	21	20
Weight, kg	70	48	59
Height, cm	168	156	156
FSH, IU/L	33	44	65
LH, IU/L	29	19	48
Estradiol, pg/mL	39	90	100
Size of the ovary (right/left), mm	Not found/<10	19 × 12/20 × 11	25 × 8/26 × 9
Follicles per ovary (right/left), n	0/0	0/2	0/0
Familial case	No	No	Yes
Other features	Behavioral disorders, progressive intellectual deficiency	None	None

Abbreviation: NA, not applicable.

15q25.2, confirmed the deletion and sequencing of the second allele of *CPEB1* was normal. Both her parents were tested by FISH analysis and no deletion was detected indicating that the deletion arose de novo. No mutation was identified using the POI gene panel, in this patient.

#### Patient 2

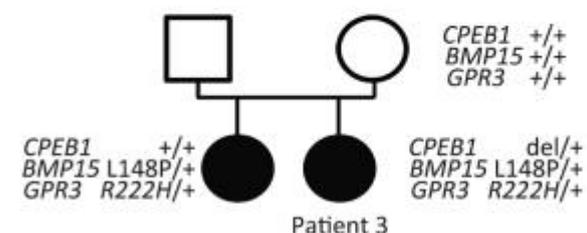
A 2.5 Mb microdeletion of the *CPEB1* gene was identified by QMPF. It was confirmed and further delineated by SNP array analysis. This microdeletion was very similar to that found in Patient 1. It extended from chromosomal base position 83213963 to 85728834 (hg19). Subsequent sequencing of the POI gene panel identified two heterozygous variations: variation P29S (rs2075789, MAF/MinorAlleleCount: T = 0.10185/510 in 1000 genomes, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=rs2075789](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs2075789)) in Mut S Homolog 5 (*MSH5*) gene and variation H208Q (rs4328642, MAF/MinorAlleleCount: A = 7.42e-05/9 in ExAc, <http://exac.broadinstitute.org/variant/2-121106850-C-A>) in inhibin B (*INHBB*) gene.

#### Patient 3

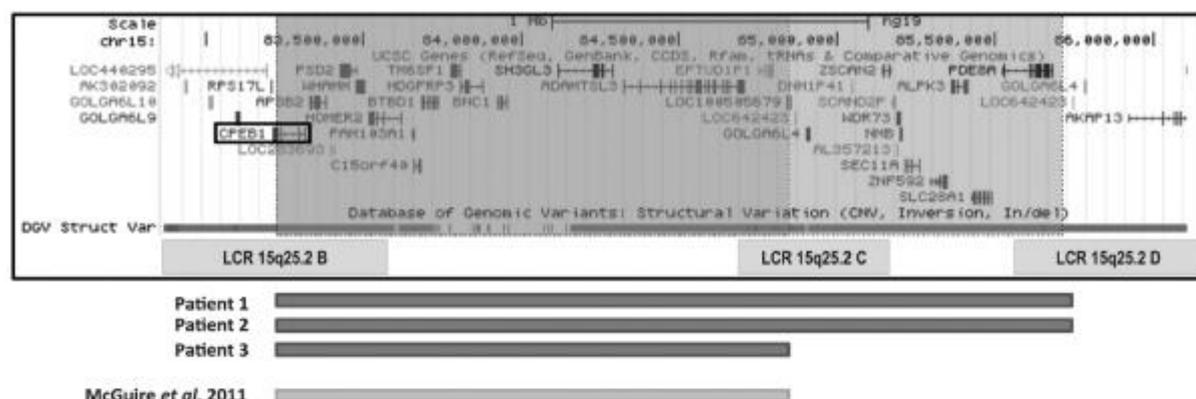
SNP analysis identified a 1.6 Mb microdeletion in 15q25.2 extending from chromosomal base position 83223426 to 84832932 (hg19). This result was confirmed by FISH analysis with BAC probe RP11–90B9. QMPF analyses in the sister and the mother were normal. Sequencing of the POI gene panel identified a L148P heterozygous mutation in the bone morphogenic protein 15 (*BMP15*) gene (rs114823607, MAF/MinorAlleleCount: 0.003386/295 in ExAc, <http://exac.broadinstitute.org/variant/X-50658871-T-C>) and a R222H heterozygous variation in the G protein-coupled receptor 3 (*GPR3*) gene (rs734852, MAF/MinorAlleleCount: A = 0.0132/66 in 1000 genomes, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=rs734852](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs734852)). Both *BMP15* and *GPR3* gene variations were also found in her sister whereas the maternal genotype was normal (Figure 2). Paternal DNA was not available for analysis.

## Discussion

Genetic causes of premature ovarian insufficiency can be identified in less than 30% of cases. Among these, copy number variations have been reported using array CGH techniques, located either on the X chromosome or on autosomes (14, 15). We describe three cases of patients with POI associated with a 15q25.2 microdeletion containing the *CPEB1* gene, in a chromosomal region known to contain four LCRs (15q25.2A to 15q25.2D) (16). In the human genome, LCRs predispose to nonallelic homologous recombination (NAHR) events, which result in recurrent chromosomal rearrangements. Some of these are not linked to the occurrence of diseases and are recurrently identified in healthy people as copy number polymorphism (17). Nowadays, many clinically recognizable syndromes are known to be due to microdeletions or microduplications mediated by LCRs that allow NAHR during meiosis (18). The proximal chromosomal breakpoint is similar in the three cases (LCR 15q25.2B), whereas the distal breakpoint decreases within LCR 15q25.2D in Patients 1 and 2 and within LCR 15q25.2C in Patient 3, thus resulting in a smaller deletion (Figure 3). No deletion or duplication mediated by LCRs 15q25.2B and 15q25.2C are reported in the Database of Genomic Variants (Supplemental Figure 1).



**Figure 2.** Pedigree of Patient 3 indicating the genetic status for *CPEB1*, *BMP15*, and *GPR3* (+ signs indicate the absence of variations).



**Figure 3.** UCSC genome browser panel displaying the deleted regions for the three patients. Genes contained in the deleted region, including *CPEB1* gene (box) as well as LCRs (LCR 15q25.2B, 15q25.2C, and 15q25.2D) are indicated in the upper panel. Dark gray bars indicate the size of the deletions in our three patients, and the light gray bar, the deletion previously reported by McGuire et al (15).

In the literature, six cases of 15q25.2 deletions have been reported in patients so far. Among them, five occurred in prepubertal individuals, carrying congenital malformations and/or cognitive deficiency (16, 19). A last case was found by McGuire et al (15) in the screening of 89 patients with POI using high-resolution SNP arrays. The study identified a total of 198 autosomal CNVs, consisting in 17 microduplications and seven microdeletions, including a 1.67 Mb deletion located on chromosome 15q25.2 (chr 15: 80972574 to 82640853) (hg17) between LCR 15q25.2B and 15q25.2C. This patient presented with primary amenorrhea. No further detailed clinical data was available.

The minimal common region (chr15: 83223426 to 84832932) (hg19) deleted in our three patients includes 12 coding sequences (Figure 3). Among them, the *CPEB1* gene is the only one known to be involved in reproduction. The *CPEB1* gene encodes for a sequence-specific RNA-binding protein that is expressed in brain, heart, testes, and oocytes. In mouse oocytes, it has been shown that *Cpeb* regulates translation (20, 21). Adult *Cpeb* knockout female mice have vestigial ovaries, devoid of oocytes. Moreover, ovaries from midgestation *Cpeb*<sup>-/-</sup> embryos contain oocytes that are arrested at the pachytene stage. Synaptonemal complexes are not detected in the ovaries of these animals (22). Therefore, we can hypothesize that the heterozygous deletion of the *CPEB1* gene in our patients leads to haploinsufficiency and consequently to POI. This is supported by the fact that no deletion of the *CPEB1* gene is reported in DGV Gold Standard Variants, which contains only variants from high-quality and accurate studies (Supplemental Figure 2). Given that primary or early-secondary amenorrhea is present in our patients, we suggest that heterozygous deletions of *CPEB1* gene are responsible for early POI in humans.

Given that *CPEB1* is located in a chromosomal region containing LCRs, we can hypothesize that involvement of this gene in POI is related to microdeletions in the 15q25.2 region rather than to *CPEB1* gene mutations. This hypothesis is strengthened by the lack of mutation in our cohort of patients screened for *CPEB1* sequence. According to our results and to McGuire's data (15), the prevalence of 15q25.2 deletions in POI is evaluated to be approximately 1%.

Interestingly, genetic investigations using our POI gene panel revealed in Patient 2, a variation in *MSH5* gene and a variation in *INHBB* gene. Both have been reported as polymorphisms in different databases (dbSNP, Ensembl, ExAc) and therefore cannot be responsible for the POI phenotype. In Patient 3 and her sister, the same gene panel identified a variation in *GPR3* gene, which is also considered a polymorphism and a L148P mutation in the *BMP15* gene (Figure 2). Given that the mother did not present the *BMP15* mutation, we can assert that both sisters inherited it from their father and that this mutation has no effect on male fertility. This *BMP15* mutation has already been reported in POI and functional analyses showed that it has deleterious effects (6, 23–25). Therefore, it could be involved in our patient's as well as in her sister's phenotypes. Interestingly, both sisters had different severities of ovarian failure. Indeed, Patient 3 had primary amenorrhea and therefore presented a more severe phenotype than her sister, who presented with secondary amenorrhea, occurring at the age of 39 years. Our result suggests that *BMP15* gene mutations and *CPEB1* gene deletions may have a cumulative effect.

In conclusion, we report three cases presenting with POI due to a 15q25.2 microdeletions including *CPEB1* gene. These microdeletions are rare, as we identified them in 1.3% of patients with POI, but recurrent as it is medi-

ated by NAHR due to LCRs located in the region. Our study illustrates the importance of DNA microarray analysis in diagnostic evaluation and counseling of patients with POI.

## Acknowledgments

We thank the patients and their families for participation in this study. We also thank Dr Olivier Lascols, who did the DNA extractions from blood samples, and the Unité de Recherche Clinique–Est (URC–Est) for the data collection.

Address all correspondence and requests for reprints to: Capucine Hyon, MD, Département de Génétique Médicale, 26 Rue du Dr Arnold Netter, 75012 Paris, France. E-mail: capucine.hyon@aphp.fr.

Authors' roles: contributions to conception and design: J.P.S., S.C.M.; acquisition of clinical data: V.K., S.J., B.D., A.G., Y.R., P.T., S.C.M.; analyses and interpretation data: C.H., L.M.H., S.C.B., C.D.; drafting: C.H., S.C.B., J.P.S., S.C.M.; revising: B.D., J.P.S., S.C.M.; final approval: C.H., L.M.H., S.C.B., B.D., V.K., C.D., S.J., B.D., A.G., Y.R., P.T., J.P.S., S.C.M.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Université Pierre et Marie Curie, and by the Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (Programme Hospitalier de Recherche Clinique No. AOM08084).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

## References

- De Vos M, Devroey P, Fauser BC. Primary ovarian insufficiency. *Lancet*. 2010;376:911–921.
- Qin Y, Jiao X, Simpson JL, Chen ZJ. Genetics of primary ovarian insufficiency: New developments and opportunities. *Hum Reprod Update*. 2015;21:787–808.
- Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, et al. The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril*. 2007;87:456–465.
- De Baere E, Lemercier B, Christin-Maitre S, et al. FOXL2 mutation screening in a large panel of POF patients and XX males. *J Med Genet*. 2002;39:e43.
- Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, Cacciatori C, Fabre S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum Reprod Update*. 2014;20:869–883.
- Laïssue P, Christin-Maitre S, Touraine P, et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*. 2006;154:739–744.
- Bouilly J, Bachelot A, Broutin I, Touraine P, Binart N. Novel NO-BOX loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Hum Mutat*. 2011;32:1108–1113.
- Janse F, de With LM, Duran KJ, et al. Limited contribution of NR5A1 (SF-1) mutations in women with primary ovarian insufficiency (POI). *Fertil Steril*. 2012;97:141–146.e2.
- Coccia ME, Rizzello F, Mariani G, Bulletti C, Palagiano A, Scarselli G. Ovarian surgery for bilateral endometriomas influences age at menopause. *Hum Reprod*. 2011;26:3000–3007.
- Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod Update*. 2012;18:525–535.
- Gallicchio L, Miller S, Greene T, Zacur H, Flaws JA. Premature ovarian failure among hairdressers. *Hum Reprod*. 2009;24:2636–2641.
- Béranger R, Hoffmann P, Christin-Maitre S, Bonnetterre V. Occupational exposures to chemicals as a possible etiology in premature ovarian failure: A critical analysis of the literature. *Reprod Toxicol*. 2012;33:269–33279.
- Yau SC, Bobrow M, Mathew CG, Abbs SJ. Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J Med Genet*. 1996;33:550–558.
- Aboura A, Dupas C, Tachdjian G, et al. Array comparative genomic hybridization profiling analysis reveals deoxyribonucleic acid copy number variations associated with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:4540–4546.
- McGuire MM, Bowden W, Engel NJ, Ahn HW, Kovanci E, Rajkovic A. Genomic analysis using high-resolution single-nucleotide polymorphism arrays reveals novel microdeletions associated with premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 2011;95:1595–1600.
- Wat MJ, Enciso VB, Wiszniewski W, et al. Recurrent microdeletions of 15q25.2 are associated with increased risk of congenital diaphragmatic hernia, cognitive deficits and possibly Diamond-Blackfan anaemia. *J Med Genet*. 2010;47:777–781.
- Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet*. 2005;77:78–88.
- Weise A, Mrasek K, Klein E, et al. Microdeletion and microduplication syndromes. *J Histochem Cytochem*. 2012;60:346–358.
- Mefford HC, Clauin S, Sharp AJ, et al. Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy. *Am J Hum Genet*. 2007;81:1057–1069.
- Gebauer F, Richter JD. Mouse cytoplasmic polyadenylation element binding protein: An evolutionarily conserved protein that interacts with the cytoplasmic polyadenylation elements of c-mos mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:14602–14607.
- Welk JF, Charlesworth A, Smith GD, MacNicol AM. Identification and characterization of the gene encoding human cytoplasmic polyadenylation element binding protein. *Gene*. 2001;263:113–120.
- Tay J, Richter JD. Germ cell differentiation and synaptonemal complex formation are disrupted in CPEB knockout mice. *Dev Cell*. 2001;1:201–213.
- lafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*. 2004;36:949–951.
- Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, et al. Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:1976–1979.
- Rossetti R, Di Pasquale E, Marozzi A, et al. BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum Mutat*. 2009;30:804–810.
- Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, et al. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet*. 2006;119:408–415.





## Résumé :

Les anomalies du développement sexuel peuvent se révéler soit par des anomalies génitales à la naissance, soit par des anomalies pubertaires mais également, chez l'adulte, par une infertilité. Les hommes 46,XX (DSD 46,XX avec développement testiculaire) présentent dans la majorité des cas un développement testiculaire normal, lié à la présence de la séquence *SRY* sur un des chromosomes X, et sont dépistés à cause de leur infertilité. En revanche dans environ 10% des cas, la cause de cette anomalie n'est pas retrouvée. Chez les femmes, les anomalies du développement sexuel peuvent se révéler par une insuffisance ovarienne prématurée (IOP) dont l'origine n'est identifiée que dans 20% des cas.

L'objectif de cette thèse a été d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans le développement gonadique, testiculaire et ovarien, ainsi que dans son fonctionnement. Les méthodes utilisées ont été des techniques d'étude globale du génome de type puce SNP et de séquençage d'exome ainsi que des techniques de séquençage ciblé.

L'étude d'une cohorte de patients DSD 46,XX *SRY* négatifs avec développement testiculaire a mis en évidence une duplication de la région *RevSex* située dans un désert génique très en amont du gène *SOX9* chez quatre patients ce qui représente environ 10% des patients testés. La plus petite duplication identifiée a permis de redéfinir la région minimale impliquée dans l'activation de l'expression de *SOX9* à une taille maximale de 41.9 kb et de proposer un mécanisme permettant cette expression chez des hommes 46,XX. Le séquençage d'exome chez dix patients de la cohorte n'a pas mis en évidence de mutations dans des gènes déjà impliqués dans les DSD ni dans de nouveaux gènes d'intérêt. Ce résultat associé à l'absence de mutations dans des gènes d'intérêts pose la question du rôle des régions régulatrices dans la survenue des DSD.

L'analyse d'une cohorte de patientes ayant une IOP a permis d'identifier des délétions incluant le gène *CPEB1*, faisant de ce dernier un candidat à la survenue d'une IOP. Cette hypothèse a été renforcée par des études précédentes chez la souris montrant son implication dans le développement folliculaire. Le séquençage du gène *CPEB1* dans la cohorte n'a pas mis en évidence de mutation pathogène. Ce travail a permis de montrer que la délétion impliquant le gène *CPEB1* est une cause rare mais récurrente d'IOP et concerne environ 1% des patientes. Une microdélétion contenant le gène *CASP3* un gène de la voie des caspases impliquée dans la régulation du pool folliculaire a également été identifiée chez une patiente. Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires pour confirmer son rôle dans la survenue d'une IOP.

L'ensemble de ces résultats montre l'intérêt de l'étude génétique des patients présentant une anomalie du développement de la gonade ou de son fonctionnement par des techniques d'étude globale du génome.

Mots clés : Anomalie du développement sexuel, *SOX9*, Insuffisance ovarienne prématurée, *CPEB1*, *CASP3*

## Genetic study of gonadal development in human

Disorders of Sex Development (DSD) can be identified in new-born and during infancy but also in adults because of infertility. Most 46,XX testicular DSD have a normal testicular development due to the presence of the *SRY* gene at the tip of one of their X chromosome and they are usually diagnosed because of their infertility. However, the genetic causes of 46,XX-SRY negative testicular DSD remain poorly defined. In women, disorders of gonadal development can be responsible for primary ovarian insufficiency (POI) and genetic causes are identified in only 20% of cases.

The aim of this thesis was to identify molecular mechanisms involved in gonadal development and in its functioning. In order to identify new genes, whole genome analysis techniques were used as SNP array and whole exome sequencing as well as targeted sequencing.

The cohort study of 46,XX testicular DSD identified four patients with a duplication in the previously reported *RevSex* region located about 550 kb upstream of *SOX9*. One duplication allowed us to refine the minimal region associated with 46,XX-SRY negative DSD to a 40.7–41.9 kb element. Exome sequencing of 10 patients from the cohort did not show any mutation in genes implicated in DSD or in new candidate genes. These results raise questions about the role of the regulatory sequences in the onset of DSD.

The cohort study of POI patients identified three patients carrying a microdeletion including *CPEB1* a good candidate gene for POI as study in mice showed the implication of *CPEB1* in follicular development. Sequencing *CPEB1* gene did not identify any mutation. Therefore, heterozygous deletion of *CPEB1* gene leading to haploinsufficiency could be responsible for POI in humans. This microdeletion is rare but recurrent and was identified in about 1% of patients with POI. Another microdeletion containing *CASP3* gene that belongs to the caspase family, which is implicated in the regulation of the follicular pool, was identified in a patient. Further studies are needed to confirm the role of *CASP3* in POI.

These results demonstrate the importance of genetic study of patients presenting with DSD or POI using whole genome techniques.

Keywords : Disorders of sex development, *SOX9*, Primary ovarian failure, *CPEB1*, *CASP3*