



HAL
open science

Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la différenciation du tractus génital masculin

Matthieu Peycelon

► **To cite this version:**

Matthieu Peycelon. Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la différenciation du tractus génital masculin. Génétique humaine. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS461 . tel-03153249

HAL Id: tel-03153249

<https://theses.hal.science/tel-03153249>

Submitted on 26 Feb 2021

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.

Sorbonne Université

École Doctorale ED515 – Complexité du vivant

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

Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la différenciation du tractus génital masculin

Matthieu Peycelon

Thèse de Doctorat de Génétique Humaine

Dirigée par Pr. Jean-Pierre Siffroi

Présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 2019

Devant un jury composé de :

Brigitte BENZACKEN	PU-PH	Université Paris 13	Rapporteur
Anne-Françoise SPINOIT	Professeur	Université de Gand	Rapporteur
Irène NETCHINE	PU-PH	Université Paris 6	Examineur
Nicolas KALFA	PU-PH	Université de Montpellier	Examineur
Alaa EL GHONEIMI	PU-PH	Université Paris 7	Président
Jean-Pierre SIFFROI	PU-PH	Université Paris 6	Directeur de thèse

Sorbonne Université

École Doctorale ED515 – Complexité du vivant

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

Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la différenciation du tractus génital masculin

Matthieu Peycelon

Thèse de Doctorat de Génétique Humaine

Dirigée par Pr. Jean-Pierre Siffroi

Présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 2019

Devant un jury composé de :

Brigitte BENZACKEN	PU-PH	Université Paris 13	Rapporteur
Anne-Françoise SPINOIT	Professeur	Université de Gand	Rapporteur
Irène NETCHINE	PU-PH	Université Paris 6	Examineur
Nicolas KALFA	PU-PH	Université de Montpellier	Examineur
Alaa EL GHONEIMI	PU-PH	Université Paris 7	Président
Jean-Pierre SIFFROI	PU-PH	Université Paris 6	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 / Sorbonne Université UMR_S933 dirigée par le Professeur Serge Amselem.

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

Car des Sciences à l'Art, il n'y a qu'un pas.

The important thing is not to stop questioning.

Curiosity has its own reason for existence.

*One cannot help but be in awe when he contemplates
the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality.
It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery each day.*

Albert Einstein

Great things are done by a series of small things brought together.

Vincent Van Gogh

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre Siffroi,

Pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de diriger cette thèse.

Nous nous connaissons et travaillons ensemble depuis huit ans et vous n'avez jamais cessé de m'aider, me conseiller, m'encourager en toute bienveillance.

Votre soutien est inestimable.

Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon plus profond respect.

A Monsieur le Professeur Alaa El Ghoneimi

Pour l'honneur que vous me faites de présider cette thèse.

Vous m'avez appris l'excellence chirurgicale, la rigueur scientifique et surtout l'intégrité.

Travailler dans votre service à vos côtés est une fierté quotidienne.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon admiration et de mes salutations les plus respectueuses.

A Madame le Professeur Brigitte Benzacken

Pour l'honneur de bien vouloir juger cette thèse.

La cytogénétique et la biologie moléculaire sont parfois bien éloignées de ma pratique quotidienne. J'espère que vous saurez apprécier ce travail de chirurgien.

Veillez trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude.

A Madame le Professeur Anne-Françoise Spinoit

Pour l'honneur d'être rapporteur de ce travail de thèse.

Tu es un modèle en Europe pour les jeunes urologues à travers tes nombreuses publications, tes travaux de recherche fondamentale et ton dynamisme qui a, depuis longtemps, dépassé les frontières belges.

Merci pour ton aide et tes conseils depuis notre rencontre à Gênes.

Trouve ici l'expression de mes plus vifs remerciements.

A Madame le Professeur Irène Netchine

Pour l'honneur de faire partie de ce jury.

L'endocrinologie pédiatrique est une des pierres angulaires de la prise en charge multidisciplinaire des patients porteurs d'une anomalie du développement génital.

Je suis honoré de votre présence

Soyez assuré de mon sincère respect et de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Nicolas Kalfa,

Pour avoir accepté de faire partie de ce jury,

Ta présence est un honneur et un plaisir. Tes travaux débutés au C.H.U. de Montpellier puis à U.C.S.F. ont toujours été un modèle dans mon parcours et j'admire ton enthousiasme, ta rigueur et ton incroyable pédagogie.

Sois assuré de ma sincère estime et de ma respectueuse reconnaissance.

Aux patients et à leur famille,

Et à ma devise, pas toujours respectée :

Ce qui vaut la peine d'être fait vaut la peine d'être bien fait.

Nicolas Poussin (1594-1665) – Correspondance (Ch. Jouanny, Paris, J. Schemit, 1911)

(Archives de l'Art français, nouvelle période, t. V, 1911.)

Résumé

Introduction. L'hypospadias est la malformation congénitale la plus fréquente des organes génitaux externes du garçon. Il faut bien distinguer deux grands cadres cliniques, dont la prise en charge est nettement différente : (1) les hypospadias distaux et isolés chez les garçons, qui représentent environ quatre cas sur cinq des hypospadias dans leur ensemble. Ils n'entraînent pas, en l'état des connaissances actuelles, de troubles mictionnels, de dysfonction érectile ou d'hypofertilité à l'âge adulte. Néanmoins, leur correction chirurgicale est nécessaire et sera expliquée lors d'une consultation avec un urologue pédiatre ; (2) Les anomalies les plus sévères, qu'il est convenu d'appeler anomalie du développement sexuel (ADS) ou *Disorders of Sex Development* (DSD) dans la littérature anglo-saxonne, requièrent une prise en charge pluridisciplinaire avec des praticiens familiers de ce type de pathologies afin d'éviter les erreurs et le retard diagnostique. L'incidence de tous les types d'hypospadias est en constante augmentation depuis deux décennies mais son étiopathogénie reste encore largement discutée, faisant intervenir des facteurs endocriniens, génétiques, vasculaires et environnementaux. Les causes génétiques de l'hypospadias, qui est donc une anomalie qui apparaît au cours de l'embryogenèse sous l'influence probable des pics d'hormone chorionique gonadotrophique (hCG) pendant le premier trimestre de grossesse qui stimulent la production de testostérone fœtale, sont encore peu explorées et probablement sous-estimées.

Objectifs. L'objectif principal était d'étudier les mécanismes génétiques impliqués dans la différenciation sexuelle masculine pour comprendre le développement normal et pathologique de l'appareil génito-urinaire masculin humain.

Objectifs secondaires :

- Colliger tous les cas d'hypospadias nés à Paris depuis 2011 en se concentrant sur les cas familiaux ou consanguins
- Rechercher l'existence éventuelle de mutations somatiques au niveau du tissu urogénital dans des gènes portés par le chromosome X ou affectés par des mutations à transmission dominante. Trois gènes candidats, connus pour être impliqués dans

la genèse de l'hypospadias, ont été sélectionnés et sont tous les liés au métabolisme des androgènes (*AR*, *MAMLD1* et *NR5A1*)

- Réaliser une étude pangénomique par puce à ADN « SNP » chez des enfants nés avec un hypospadias distal isolé et leurs parents puis réaliser une étude par WES pour les cas familiaux et consanguins
- Identifier, enfin, une potentielle association entre le taux sérique maternel d'hormone chorionique gonatrophique béta libre (hCGb) et la survenue d'un hypospadias.

Matériels et méthodes. Une première cohorte de 284 patients pris en charge pour chirurgie d'hypospadias a été établie depuis 2011 dans laquelle 223 garçons présentent un hypospadias distal isolé sans consanguinité ni origine familiale. L'ADN germinale de ces patients a été extrait des lymphocytes sanguins selon la technique habituelle. Un caryotype standard puis une analyse pangénomique par puce à ADN « SNP 12 chips (Illumina®) » ont été réalisés pour tous les patients. Les familles des 33 premiers cas ont été sélectionnées chronologiquement pour bénéficier d'un séquençage des trois gènes candidats à partir de l'ADN des lymphocytes sanguins, des fibroblastes issus d'une culture de biopsie de prépuce et des frottis urétraux réalisés lors de l'intervention chirurgicale. Les cas familiaux et consanguins ont eu une recherche de nouveaux gènes par Whole Exome Sequencing (WES).

Une seconde cohorte de 1311 femmes enceintes qui ont donné naissance à un enfant vivant unique de sexe masculin avec une malformation congénitale a été établie entre 2011 et 2016 d'après le registre francilien REMAPAR. Ont été extraites les données cliniques et paracliniques des 170 garçons nés avec un hypospadias isolé, confirmé par l'examen clinique d'un chirurgien pédiatrique. Les taux sériques de la sous-section béta d'hCG libre ont été obtenus par un laboratoire centralisé. Les multiples de la médiane (MoM) de la béta-hCG libre obtenues entre la 10^{ème} et la 13^{ème} semaine d'aménorrhée ont été comparées entre les garçons porteurs d'un hypospadias et le groupe contrôle. Le test statistique a inclus une régression quantile en évaluant par ailleurs les confondants potentiels liés à la dysfonction placentaire.

Cohorte Exome

Résultats.

1) Les techniques d'extraction d'ADN sanguin et préputial (N=33) ont été qualitativement et quantitativement satisfaisantes ; en revanche, l'extraction d'ADN à partir de cellules urétrales a présenté un rendement faible et peu reproductible. Nous avons réalisé la mise au point de l'amplification et du séquençage des trois gènes à partir du matériel génomique des trois types cellulaires. La caractérisation du transcrit majoritaire du gène *MAMLD1* au niveau du tissu d'intérêt, a permis de mettre en évidence une isoforme de sept exons dont les régions codantes n'ont pas été étudiées en totalité dans les études précédentes. Aucune mutation n'a été retrouvée pour les trois gènes candidats, que ce soit au niveau germlinal (N=33), préputial (N=23) ou urétral (N=2). Des variations introniques non décrites des gènes *AR* (N=2), *MAMLD1* (N=2) et *NR5A1* (N=1) ont été retrouvées mais ne semblent pas susceptibles d'altérer l'épissage. Concernant le gène *AR*, six cas de différence dans la longueur de répétition des polyglutamines (triplets de CAG) localisées dans une région codante (exon 1) ont été retrouvées entre la séquence de l'ADN lymphocytaire et fibroblastique. Un changement de plus de deux triplets de CAG triplets a été identifié chez deux patients.

2) Une duplication hétérozygote intragénique du gène *NR5A1* (codant pour la protéine SF-1) au niveau d'une région répétée de séquence (CTGCAGCTG) $\times 2$ a été identifiée chez un individu de 15 ans 46,XY DSD (*disorder of sex development*). Il présentait cliniquement un micropénis associé à un hypospadias proximal sévère ayant nécessité une prise en charge mixte par les équipes d'endocrinologie et d'urologie pédiatrique. Cette duplication hétérozygote a déjà été décrite à deux reprises chez des individus de sexe masculin avec un phénotype similaire, alors qu'une délétion de trois acides aminés dans cette position au sein de la protéine SF-1 a été retrouvée chez un individu de sexe féminin 46,XX avec un retard de croissance staturo-pondérale et une insuffisance ovaire prématurée. Ces données suggèrent que cette région particulière au sein de gène *NR5A1* a un rôle important dans la traduction de la protéine SF-1 sur son action gonadique et une région sensible aux réarrangements intragéniques.

3) Un total de 41 patients présentait une variation du nombre de copie non connue dans les bases de données internationales. L'étude de ségrégation familiale a mis en évidence un caractère héréditaire chez six patients. Trente-cinq anomalies (15,7%) pouvant être en

lien avec la survenue d'un hypospadias distal isolé ont été identifiées par puces à ADN. Une seule translocation 46,XY,t(7;11)(p14;q23) *de novo* a été visible sur le caryotype. Des variations du nombre de copies susceptibles d'être impliquées dans cette pathologie étaient présentes chez 30 patients : 17 duplications, six double-duplications, trois délétions, deux délétions avec duplication et une translocation avec duplication, qui englobent un total de 25 gènes candidats impliqués dans la différenciation testiculaire, la synthèse des androgènes, le développement de l'hypophyse et la traduction de facteurs de transcription. L'étude pangénomique a retrouvé des régions d'homozygotie > 2 Mb chez cinq patients, qui pourraient abriter des gènes candidats à mutation homozygote.

4) Chez les 30 patients avec un hypospadias à caractère familial ou consanguin, 22 nouveaux variants ont été identifiés par WES.

5) La MoM médiane de béta-hCG libre était de 0,99 (0,29-5,8) parmi les femmes enceintes avec un futur enfant porteur d'un hypospadias, quel que soit sa classification clinique et de 0,95 (0,04-7,0) dans le groupe contrôle. Aucune corrélation statistique entre le taux de béta-hCG et la survenue d'un hypospadias n'a été retrouvée ($p=0,3$). Un second test statistique a été modélisé afin de prendre en compte le type d'hypospadias (distal, proximal, non spécifié): de façon intéressante, une différence significative a été identifiée avec une augmentation significative du taux de béta-hCG en cas de forme sévère [1,49 (0,62-5,8) pour les hypospadias proximaux (N=13) versus 0,92 (0,29-4,54) pour les formes distales (N=119), et 1,05 (0,35-5,35) pour les cas non spécifiés (N=38), $p=0,02$]. Cette association statistique reste significative après ajustement pour la dysfonction placentaire (prématurité, retard de croissance intra-utérin et petit poids de naissance) ($p=0,006$).

Discussion et conclusion. L'étude des trois premiers gènes candidats n'a pas pu vérifier l'hypothèse selon laquelle les séquences germinales et somatiques seraient différents. Cependant, compte tenu du faible effectif analysé et de l'absence de stratification selon le type d'hypospadias, l'étude d'un plus grand nombre de patients est nécessaire afin d'exclure l'implication de mutations somatiques.

L'analyse pangénomique par puces à ADN a trouvé de façon surprenante 15,7% anomalies susceptibles d'être en lien avec la survenue d'un hypospadias distal isolé. L'utilisation de

ces nouveaux outils d'analyse génétique semble essentielle à la compréhension des mécanismes de survenue de cette pathologie malgré un conseil génétique potentiellement difficile, tout comme l'illustre l'identification de 22 nouveaux variants lors de l'étude des 30 cas familiaux et consanguins.

Enfin, nos données valident l'hypothèse selon laquelle une altération du taux de béta-hCG maternel pourrait être associé à la survenue d'un hypospadias. Des taux plus élevés de béta-hCG ont été retrouvés plus fréquemment chez les enfants avec un hypospadias proximal. Parce que notre cohorte inclut un nombre peu élevé d'enfants nés avec un hypospadias, d'autres études sont nécessaires et ces résultats préliminaires doivent être interprétés avec précaution.

Mots-clés. Hypospadias ; Anomalies du Développement Génital ; Génétique ; Enfant ; Séquençage Génome Entier ; Hormone Chorionique Gonadotrophique ; Polymorphisme ; Récepteurs aux androgènes ; *Steroidogenic Factor 1*.

Abstract

Background. Hypospadias is the most common malformation affecting the male genitalia, and its incidence is increasing significantly and has doubled in the last two decades. Although the causes remain often unknown, endocrine, vascular and environmental factors have been implicated. The genetic basis, more particularly in the case of minor forms of hypospadias, is probably underestimated. In the human species, a genetic origin of hypospadias has been suspected by studies of a large number of families that have shown family aggregation in about 10% (from 4% to 25%) of cases and an incidence of malformation in fathers of affected subjects in 7% of cases. These studies have also shown that multifactorial inheritance was involved in the majority of cases while monogenic forms were rather rare. Whatever its type (proximal or distal), hypospadias appears to be a lack of action of androgens in the target tissue that is the genital tubercle in the male fetus between the ninth and the fourteenth week of development. Human chorionic gonadotrophin (hCG) peaks in the first trimester of pregnancy stimulate fetal testosterone production and normal male genital development. One potential etiological pathway of hypospadias could be an altered release of hCG leading to androgen deficiency.

Objectives. The aim of this project was to study genetic factors implicated in sexual differentiation, *i.e.* the steps leading to anatomical modifications of genitourinary tract and external male genitalia.

Secondary objectives:

- 1) To collect all cases of hypospadias born in Paris since 2011 and to focus on familial (father-son or brothers) or consanguineous cases
- 2) To investigate the existence of mutations of three candidates genes (*AR*, *MAMLD1* and *NR5A1*) in the germinal cells and in the urogenital tissue of patients with hypospadias
- 3) To use a pangenomic tool with a SNP-array to find candidate genes in regions of homozygosity
- 4) To perform a whole exome sequencing (WES) analysis to highlight new genes involved in the differentiation of the external genitalia

- 5) To identify an association between maternal first trimester levels of serum free-beta hCG and occurrence of hypospadias.

Methods. A cohort of 284 children born with hypospadias has been established since 2011 of whom 223 boys had distal hypospadias. Genomic DNA was extracted from blood lymphocytes using standard techniques. A systematic karyotype was realized in all patients. SNP-array analysis was made using Cyto SNP 12 chips (Illumina®). A secondary study using WES was used to search for mutations with recessive transmission in candidate genes. Sanger sequencing of *AR*, *MAMLD1* and *NR5A1* was performed on DNA extracted from blood lymphocytes and fibroblasts obtained after a foreskin biopsy.

Another cohort of 1,311 pregnant women who gave birth to a singleton live born male infant with a congenital malformation was established from the REMAPAR database. Of these, 170 boys were diagnosed with an isolated hypospadias, confirmed by operative note. Serum levels of free-beta hCG were ascertained from laboratory databases and serum levels of total hCG were measured out. Free-beta hCG multiple of the median (MoM) measured between 10 and 13 gestational weeks (GW) were compared between affected and unaffected boys. Statistical tests including quantile regression were used to evaluate the associations (overall and then according to placenta dysfunction).

Results.

- 1) The first 33 hypospadiac penis were classified in posterior (11), middle (10), and anterior (12). DNA extractions from fibroblasts were qualitatively and quantitatively satisfactory. Non-described variations of *AR* (N=2), *MAMLD1* (N=2) and *NR5A1* (N=1) were identified without any splicing activity. No mutation in the three candidate genes was found, either in blood or fibroblastic tissues. Six cases of discrepancy in the length of polyglutamine stretches (CAG triplets) located in a coding region in *AR* gene were identified between lymphocytes and fibroblasts. A change of more than two CAG triplets between the different tissues was found in two patients.

- 2) A heterozygous intragenic duplication within the repeated area (CTGCAGCTG) \times 2 of the *NR5A1* gene was found in a 15-year-old 46,XY DSD (disorders/differences of sex development) patient with a micropenis and a proximal hypospadias. This heterozygous

duplication has already been described twice in boys with a similar phenotype, whereas a deletion of 3 amino acids at the same position in the protein SF-1 has been described in a 46,XX patient with primary ovarian failure and short stature. These data suggest that this region within the *NR5A1* gene has an important role for SF-1 protein function in gonads and is a hotspot for intragenic rearrangements.

3) Forty-one patients presented Copy Number Variants (CNVs) unlisted in international databases. Familial study revealed parental heredity in six cases. Thirty-five anomalies (15.7%) that could be a potential cause of hypospadias were identified by SNP-array in this cohort of children with isolated distal non-hereditary hypospadias. One case of *de novo* translocation 46,XY,t(7;11)(p14;q23) has been identified from a karyotype. Thirty patients presented copy number variations (CNVs) which were likely to be implicated in this pathology: 17 duplications, six double duplications, three deletions, two deletions with duplications, one translocation with a duplication, encompassing a total of 25 candidate genes involved in testicular differentiation, androgen synthesis, pineal gland development and transcription factors. SNP-array analysis detected shared regions of homozygosity > 2 Mb in five patients which may harbor homozygous mutations in candidate genes.

4) We identified, in 30 familial or consanguineous cases of hypospadias, 22 variants classified as pathogenic or likely pathogenic.

5) Median free-beta hCG MoM was 0.99 (0.29-5.8) amongst women with an infant with hypospadias whatsoever its classification and 0.95 (0.04-7.0) in cases of unaffected boys. No statistical correlation with free beta-hCG as found in any hypospadias ($p=0.3$). A second model was done introducing types of hypospadias (distal, proximal, and unspecified): there was interestingly a significant difference with an increase in levels of free-beta hCG for severe types [1.49 (0.62-5.8) in proximal hypospadias (N=13) versus 0.92 (0.29-4.54) in distal hypospadias (N=119), and 1.05 (0.35-5.35) in unspecified hypospadias (N=38), $p=0.02$]. This association remained significant after adjusting for suspected placenta dysfunction (prematurity, intrauterine growth retardation or low birth weight) ($p=0.006$).

Conclusion. In six patients out of 33, a difference in the number of CAG triplets in *AR* gene between blood and fibroblasts was observed. However, given the small number of cases analyzed, further study of a larger number of patients is necessary to assert the involvement of variations of *AR* sequence in foreskin fibroblasts.

Pangenomic analysis found surprisingly 15.7% anomalies which could be likely linked to isolated distal non-hereditary hypospadias. This study highlights the usefulness of SNP-array in malformations with potential genetic causes and raises the issue of difficulties in genetic counseling. The use of whole exome sequencing could be an attractive method for exploring further these results as we identified 22 variants in 30 cases of familial hypospadias.

Our findings support the hypothesis that an alteration in maternal hCG levels is associated with the development of hypospadias. Higher free-beta hCG values were moreover found in children with proximal hypospadias. Because the cohort included a small number of affected patients, further studies are needed, and these preliminary results should be interpreted with caution.

Keywords.

Hypospadias; Disorders of Sex Development, 46,XY; Sex Chromosome Disorders of Sex Development; Genetics; Child; Whole Exome Sequencing; Chorionic Gonadotropin, beta Subunit, Human; Polymorphism, Single Nucleotide; Receptors, Androgen; Steroidogenic Factor 1.

Sommaire

Remerciements	3
Résumé	5
Abstract	10
Sommaire	14
Liste des abréviations	17
Liste des annexes	22
I. Introduction	23
A. Développement sexuel	24
1. Développement de la gonade	24
2. Développement des voies génitales et des organes génitaux externes	27
B. Facteurs génétiques impliqués dans le développement gonadique	31
1. Gènes impliqués dans la formation de la gonade bi-potentielle	31
2. Gènes impliqués dans le déterminisme testiculaire	34
3. Gènes impliqués dans le déterminisme ovarien	47
C. Facteurs génétiques impliqués dans la différenciation sexuelle	51
1. Synthèse des hormones stéroïdes et DSD (Tableau 3)	51
2. Anomalies de la réceptivité : insensibilité complète ou partielle aux androgènes	53
3. Cryptorchidie bilatérale et anorchidie	57
D. Facteurs non génétiques impliqués dans le déterminisme testiculaire et la différenciation sexuelle	59
1. Perturbateurs endocriniens	59
2. Facteurs associés à la grossesse	61
3. Facteurs vasculaires	64
E. Hypospadias	66
1. Epidémiologie	66
2. Anatomie et classification	66
3. Base génétique des hypospadias	68
4. Prise en charge chirurgicale	73
II. Objectifs de l'étude	80
III. Matériels et méthodes	82
A. Patients	82
1. Cohorte 1 : 46,XY DSD	83
2. Cohorte 2 : Hypospadias isolé	84
3. Cohorte 3 : REMAPAR	84
B. Etude génétique pangénomique	87
1. Historique des techniques d'analyse génétique pangénomique	87
2. Technique de cytogénétique conventionnelle (caryotype)	87
3. Analyse chromosomique sur puce ADN (ACPA)	88
4. Interprétation des données d'ACPA	91

C.	Etude génétique ciblée	92
1.	ADN génomique sanguin	92
2.	ADN génomique tissulaire.....	92
3.	Mise au point et automatisation des réactions de PCR et de séquençage	94
IV.	Résultats et discussion.....	98
A.	Comparaison de la séquence du gène du récepteur aux androgènes (<i>AR</i>), du gène <i>MAMLD1</i> et du gène <i>NR5A1</i> dans les lymphocytes sanguins et les fibroblastes de la peau du prépuce dans une cohorte de garçons avec un hypospadias.....	99
1.	Etude du gène du récepteur aux androgènes (<i>AR</i>)	99
2.	Étude du gène <i>MAMLD1</i>	116
3.	Étude du gène <i>NR5A1</i>	126
4.	Conclusion générale sur la recherche de mosaïques somatiques dans les gènes <i>AR</i> , <i>MAMLD1</i> et <i>NR5A1</i>	131
B.	Duplication intragénique dans le gène <i>NR5A1</i> et anomalie de la différenciation sexuelle.....	133
1.	Patient.....	133
2.	Méthodes	135
3.	Résultats	136
4.	Discussion.....	137
C.	Recherche de microremaniements chromosomiques par l'étude systématique de cas de DSD et d'hypospadias en puce ADN de type SNP (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>).	139
1.	Patients	139
2.	Matériel et méthodes.....	140
3.	Résultats	141
D.	Analyse de la relation entre le taux d'hormone chorionique gonadotrophique (hCG) dans le sang maternel et la survenue d'un hypospadias	154
1.	Matériel et méthodes.....	156
2.	Résultats	159
3.	Discussion.....	163
E.	Étude de cas familiaux et/ou consanguins d'hypospadias par séquençage d'exome (WES)	169
1.	Méthodes	170
2.	Résultats	175
3.	Discussion.....	177
V.	Discussion générale	180
VI.	Conclusion et perspectives.....	184
VII.	Bibliographie.....	186
VIII.	Valorisation du travail de thèse	213
A.	Articles originaux avec comité de lecture.....	213
B.	Revue avec comité de lecture.....	213
C.	Publications didactiques	214
D.	Article accepté avec modifications mineures	214
E.	Articles en cours de relecture par les co-auteurs.....	214
F.	Communications en congrès	215
IX.	Annexes.....	220
	Table des illustrations	249

Table des tableaux	251
Articles publiés dans la thématique	253
A. Article 1 : Anomalies du pénis chez l'enfant. [Abnormalities of the genitalia in boys].	253
B. Article 2 : Prise en charge néonatale des anomalies des organes génitaux : le point de vue du chirurgien	253
C. Article 3 : Génitoplastie masculinisante	253
D. Article 4 : Refining the regulatory region upstream of SOX9 associated with 46,XX testicular Disorders of Sex Development (DSD).....	253
E. Article 5 : Pathogenic variants in the DEAH-box RNA helicase DHX37 are a frequent cause of 46,XY gonadal dysgenesis and 46,XY testicular regression syndrome	253

Liste des abréviations

		ARNm	Acide ribonucléique
		messenger	
		ARV	Antirétroviral
		ARX	<i>Aristaless Related Homeobox</i>
°C	Degré Celsius	ASMT	<i>Acetylserotonin O-Methyltransferase</i>
3βHSD II	3-béta HydroxyStéroïde Déshydrogénase II	Asn	Asparagine
17 βHSD3	17-béta HydroxyStéroïde Déshydrogénase III	ATC	Association des Techniciens de Cytogénétique
ABCC13	<i>ATP Binding Cassette Subfamil C Member 13</i>	ATCG	Adenine, thymine, cytosine, guanine
ACLF	Association de Cytogénétique de Langue Française	ATF6	<i>Activating Transcription Factor</i>
ACMG	<i>American College of Medical Genetics</i>	ATS	AntiThyroïdien de Synthèse
ACPA	Analyse Chromosomique sur Puce ADN	BAM	<i>Binary Alignment / Map</i>
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>	BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
AD	Autosomique dominant	BMP	<i>Bone Morphogenic protein</i>
ADG	Anomalie du développement génital	BNC	<i>Basonuclin</i>
ADN	Acide DéoxyriboNucléique	BPES	<i>Blepharophimosis, Ptosis, Epicanthus inversus Syndrome</i>
ADS	Anomalie de la Différenciation Sexuelle	BRCA	<i>Breast Cancer</i>
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien	BWA	<i>Burrows-Wheeler Aligner</i>
AKR1C	<i>Aldo-keto reductase 1C</i>	byg	<i>boygirl</i>
AMH	<i>Anti-Mullerian Hormone</i>	CGD	<i>Complete Gonadal Dysgenesis</i>
AMH-R	<i>Anti-Mullerian Hormone Receptor</i>	CA	<i>California</i>
AMP	Assistance Médicale à la Procréation	CACNAC1	<i>Calcium voltage-gated channel Subunit Alpha 1 C</i>
Ant	Antérieur	CAG	Polyglutamine
AP-HP	Assistance Publique – Hôpitaux de Paris	CAIS	<i>Complete Androgen Insensitivity Syndrome</i>
ar	Autosomique récessif	Cauc	Caucasien
AR	<i>Androgen Receptor</i>	Cbx2	<i>Chromobox homolog 2</i>
ARE	<i>Androgen Responsive Element</i>	CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
ARFGEF3	<i>ADP ribosylation factor Guanine nucleotide exchange factors family member 3</i>	CHRNA7	<i>Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 7 Subunit</i>
ARN	Acide RiboNucléique	CIM	Classification Internationale des Maladies
		CNG	Centre national de génotypage
		CNP	<i>Copy Number Polymorphism</i>

CNV	<i>Copy Number Variation</i>	DI	Déficiencia intellectuelle
CRIPAK	<i>Cysteine Rich P21 (RAC1) Activated Kinase 1 Inhibitor</i>	Dist.	Distal
CSTF	<i>Cleavage Stimulation Factor</i>	dL	décilitre
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>	DMRT	<i>Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor</i>
CTNNB1	<i>Cadherin-Associated Protein beta</i>	DMSO	DiMéthylSulfOxyde
CUX1	<i>Cut-like Homeobox 1</i>	DNA	<i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
Cxorf6	<i>Chromosome X open reading frame 6</i>	dpc	<i>days post-coitum</i>
CYB5A	<i>Cytochrome B5 Type A</i>	DPY19L2	<i>Dumpy 19 like 2</i>
CYP11A1	<i>Cytochrome P450 Subfamily C11A1</i>	DS	<i>Down Syndrome</i>
CYR61	<i>Cysteine rich angiogenic inducer 61</i>	DSD	<i>Disorders/Differences of Sex Development</i>
Cys	Cysteine	dup	duplication
D	Day	ED	École Doctorale
DANN	<i>Deep Annotation Neural Network</i>	EDTA	<i>Ethylene diaminetetraacetic acid</i>
DAX1	<i>Dosage sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, X chromosome gene 1</i>	e.g.	<i>exempli gratia</i>
DBD	<i>DNA binding domain</i>	Emx2	<i>Empty spiracles homeobox 2</i>
dbSNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism database</i>	Enh	<i>Enhancer</i>
DDX56	<i>Dead box Helicase 56</i>	EPB	<i>Erythrocyte Membrane Protein Band</i>
DECIPHER	<i>Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources</i>	EphB2	<i>Ephrin type B receptor 2 precursor</i>
DE	Delaware	ESPE	<i>European Society of Pediatric Endocrinology</i>
Del	deletion	ESR2	<i>estrogen receptor 2 et alters</i>
DEPP1	<i>Decidual Protein Induced By Progesterone</i>	EUROCAT	<i>European Concerted Action on Congenital Anomalies and Twins</i>
DES	Diethylstilbestrol	Ex	Exon
ddNTP	<i>Dideoxynucleotides triphosphates</i>	ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
DG	Dysgénésie gonadique	EVS	<i>Exome Variant Server</i>
DGKK	<i>Diacylglycerol Kinase Kappa</i>	EYA	<i>Eyes Absent Homolog</i>
DGV	<i>Database of Genomic Variants</i>	F	<i>Forward</i>
DHH	<i>Desert hedgehog</i>	FATHMM	<i>Functional Analysis Through Hidden Markov Models</i>
DHSRX	<i>Dehydrogenas reductase SDR Family Member on Chromosome X</i>	FGFR2	<i>fibroblast growth factor receptor 2</i>
DHT	DiHydroTestostérone	FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
DHX37	<i>DEAH-box RNA helicase</i>	FIV	<i>Fécondation In Vitro</i>
		FKBP52	<i>FK506 binding protein</i>
		FOG	<i>Friend of GATA2</i>
		FOXL2	<i>Forkhead-box L2</i>
		FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>

FSHR	<i>Follicle Stimulating Hormone Receptor</i>	IC	Intervalle de confiance
g	gramme	ICSI	<i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i>
GA	<i>Gestational Age</i>	IMC	Indice de masse corporelle
GADD45	<i>Growth Arrest and DNA Damage</i>	IN	Indiana
GATA4	<i>GATA binding protein 4</i>	Inc.	<i>Incorporated</i>
GATK	<i>Genome Analysis Tool Kit</i>	INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
GGn	polyglycine	INSL3	<i>Insulin like 3</i>
GHU	Groupe Hospitalier Universitaire	IQ	Interquantile
GLI2	<i>Glioma-associated oncogene Family Zinc Finger 2</i>	IRX	<i>Iroquois homeobox factor</i>
Gln	Glutamine	ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
Gly	Glycine	IVF	<i>In vitro fertilization</i>
GnRH	<i>Gonadotrophin-releasing hormone</i>	J.-P.	Jean-Pierre
GTG	<i>G-bands by Trypsin using Giemsa</i>	JRC	<i>Joint Research Center</i>
GW	<i>Gestational week</i>	KAL	<i>Kallmann Syndrome 1</i>
GWAS	<i>Genome Wide Association Study</i>	KANSL1	<i>KAT8 regulatory NSL complex, subunit 1</i>
H.	Hypospadias	Kb	Kilobase
H ₂ O	Eau	KCTD7	<i>Potassium channel tetramerization domain-containing protein 7</i>
hCG	Hormone Chorionique Gonadotrope	KO	<i>Knock out</i>
hCGb	Hormone Chorionique Gonadotrope libre	KTS	Lysine, threonine, serine
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>	LBD	<i>Ligand binding domain</i>
HERPUD1	<i>Homocysteine-Inducible, Endoplasmic Reticulum Stress-Inducible, Ubiquitin-Like Domain Member 1</i>	LBW	<i>Low Birth Weight</i>
hg	<i>Human genome</i>	LC	<i>Leydig cell</i>
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>	Leu	Leucine
HHAT	<i>Hedgehog acyltransferase</i>	LGRF8	<i>Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 8</i>
HIPK3	<i>Homeodomain Interacting Protein Kinase 3</i>	LH	<i>Luteinizing hormone</i>
Hisp	Hispanique	LHCGR	<i>Luteinizing hormone / Choriogonadotropin Receptor</i>
HMG	<i>High Mobility Group</i>	Lhx9	<i>Lim-like homeodomain protein 9</i>
HOXA13	<i>Homeobox A13</i>	LINC	<i>Long Intergenic Non Protein Coding RNA</i>
HR	<i>Hazard ratio</i>	Ln	<i>Natural Logarithm</i>
HSD3B2	<i>Hydroxy-Delta-5-Steroid Dehydrogenase, 3 Beta-And Steroid Delta-Isomerase 2</i>	LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
HSD17B3	<i>17 beta hydroxysteroid dehydrogenase 3</i>	LQL	Leucine Glutamine Leucine
		m	mètre
		m	minimum
		M	Maximum
		MA	Massachusetts
		MAF	<i>Minor Allele Frequency</i>

MafB	<i>MAF BZIP transcription factor B</i>	QMPSF	<i>Quantitative Multiplex PCR of short fluorescent fragments</i>
MAMLD1	<i>MAsterMind-Like Domain containing 1</i>	Xp	Bras court
MAP3K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>	p	<i>p-value</i>
MaxEnt	<i>Maximun Entropy for modeling species niches and distribution</i>	PAIS	<i>Partial Androgen Insensivity Syndrome</i>
Mb	Mégabase	PAR	<i>Pseudo Autosomal Region</i>
Met	Méthionine	PAX6	<i>Paired box 6</i>
MgCl ₂	Chlorure de magnésium	pb	Paire de bases
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>	PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
MIR30A	<i>MicroRNA 30A</i>	PBX	<i>Pre-B-cell leukemia transcription factor 1</i>
MO	Missouri	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
MOM	<i>Multiple of median</i>	PFAA	<i>Perfluoroalkyl acid</i>
Moy	Moyenne	PGC	<i>Primordial Germ Cells</i>
MTM1	<i>Myotubularin 1</i>	PGD	<i>Partial Gonadal Dysgenesis</i>
Myh	<i>Mut Y DNA Glycosylase</i>	PGD	Prostaglandine
N	Nombre	Pip	<i>Prolacin Induced Protein</i>
NA	<i>Not available</i>	PKA	<i>Protein Kinase A</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	pLI	<i>Probability of being loss-of-function intolerant</i>
ND	Non Déterminé	PM	<i>Particule matter</i>
ng	nanogramme	PMA	Procération Médicalement Assistée
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>	POR	<i>Cytochrome P450 oxydoreductase</i>
NR0B1	<i>Nuclear receptor subfamily 0 group B member 1</i>	Pr.	Professeur
NR5A	<i>Nuclear Receptor subfamily 5 group A member</i>	Préop	Préopératoire
NUP107	<i>Nucleoporin 107</i>	Prox.	Proximal
OBR1	<i>Oxysterol-binding protein</i>	PSMC3IP	<i>Homologous-pairing protein 2 homolog</i>
OCP	<i>Oral contraceptive pill</i>	PTGDS	<i>Prostaglandine D2 Synthase</i>
oe	<i>observed / expected</i>	PU-PH	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
OGE	Organes génitaux externes	q	Bras long
OGFRL1	<i>Opiod growth factor receptor-like pteoin 1</i>	R	Reverse
OH	Ohio	R.C.I.U.	Retard de Croissance Intra-Utérin
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>	Réf.	Référence
OR	Odds ratio	REMAPAR	Registre des Malformations Congénitales de Paris
P450scc	<i>P450 Side Chain Cleavage</i>	RFXP2	<i>Relaxin Insulin Like Family Peptide Receptor 2</i>
PCB	<i>Polychlorinated biphenyl</i>	RHG	<i>R-bands by Heating using Giemsa</i>
PELP1	<i>Proline, Glutamate And Leucine Rich Protein 1</i>	ROH	<i>Regions of Homozygocity</i>
PER	<i>Period Circadian Regulator</i>	rpm	<i>revolutions per minute</i>
Phe	Phénylalanine		
PIS	<i>Polled/Intersex Syndrome</i>		

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>	TRS	<i>Testicular Regression Syndrome</i>
rs	<i>Reference SNP</i>	TSPYL1	<i>Testis specific Y encoded like protine 1</i>
RSPO1	<i>R-spondin 1</i>	TTP	<i>Tristetrapoline</i>
RT	<i>Reverse Transcription</i>	ttt	<i>traitement</i>
RXFP2	<i>Relaxin/Insulin-like Family Peptide receptor 2</i>	TX	<i>Texas</i>
s	<i>seconde</i>	Tzf	<i>Testicular Zinc Finger</i>
SA	<i>Semaines d'Aménorrhées</i>	Tzf-L	<i>Testicular Zinc Finger Protein Ligand</i>
SDR	<i>Short chain dehydrogenase / reductase</i>	UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
Ser	<i>Serine</i>	UI	<i>Unité internationale</i>
SF1	<i>Steroidogenic Factor 1</i>	UMR	<i>Unité Mixte de Recherche</i>
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>	UPD	<i>Uniparental Disomy</i>
SGA	<i>Small for gestational age</i>	USA	<i>United States of America</i>
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>	UTR	<i>Untranslated region</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>	v	<i>version</i>
SNV	<i>Single Nucleotide Variations</i>	Val	<i>Valine</i>
SOX	<i>SRV-related HMG-box</i>	VEP	<i>Variant Effect Predictor</i>
SR	<i>Sex Reversal</i>	VND	<i>Variant non décrit</i>
SRD5A2	<i>Steroid 5-alpha-reductase</i>	VOUS	<i>Variant Of Unknown Significance</i>
SRT	<i>Syndrome de regression testiculaire</i>	vs.	<i>versus</i>
SRY	<i>Sex-determining Region Y</i>	WAGR	<i>Wilms tumor, aniridia, genitourinary anomalies and mental retardation</i>
SSF	<i>Splicing Site Finder</i>	WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>
SSM	<i>Slipped Strand Mispairing</i>	WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
StAR	<i>Steroidogenic Acute Regulatory protein</i>	WI	<i>Wisconsin</i>
STS	<i>Steroide sulfatase</i>	WNT	<i>Wingless related-MMTV Integration site</i>
t	<i>Translocation</i>	WNT4	<i>Wnt family member 4</i>
T	<i>Testostérone</i>	WT1	<i>Wilms tumor 1</i>
TAD	<i>Topological Association Domains</i>	WWOX	<i>WW domain-containing oxidoreductase</i>
TBL1XR1	<i>Transducin Beta Like 1 X linked receptor 1</i>	XL	<i>lié à l'X</i>
TBX1	<i>T-box transcription factor</i>	YL	<i>lié à l'Y</i>
TCP11L1	<i>T-complex protein 11-like protein 1</i>	Yrs.	<i>years</i>
TDF	<i>Testis determining factor</i>	ZEB1	<i>Zinc finger E-box Binding Homeobox 1</i>
TDS	<i>Testicular dysgenesis syndrome</i>	ZFH3	<i>Zinc Finger Homeobox 3</i>
TES	<i>Testis-specific Enhancer</i>	ZNF	<i>Zinc Finger</i>
TESCO	<i>Testis-specific Enhancer Core</i>	ZFP	<i>zinc finger protein</i>
Thr	<i>Threonine</i>		
TMBIM4	<i>Transmembrane BAX inhibitor motif containing 4</i>		

Liste des annexes

Annexe 1. Fiche de recueil du généticien.....	221
Annexe 2. Fiche de recueil clinique peropératoire.	222
Annexe 3. Fiche de recueil postopératoire.	223
Annexe 4. Formulaire d'information et de consentement.	224
Annexe 5. Principe de la puce à ADN SNP-array Illumina.	228
Annexe 6. Protocole d'extraction d'ADN de lymphocytes sanguins.	229
Annexe 7. Protocole d'extraction d'ADN de fibroblastes issus de la culture de biopsie préputiale.	232
Annexe 8. Mode opératoire d'amplification et de séquençage du gène <i>AR</i>	235
Annexe 9. Mode opératoire d'amplification et de séquençage du gène <i>MAMLD1</i>	238
Annexe 10. Mode opératoire d'amplification et de séquençage du gène <i>NR5A1</i>	240
Annexe 11. Alignement protéique interespèces de la protéine AR.	242
Annexe 12. Alignement protéique interespèces des trois isoformes de la protéine MAMLD1.....	244
Annexe 13. Alignement protéique interespèces de la protéine NR5A1.....	247

I. Introduction

Le sexe d'un individu peut être défini à plusieurs niveaux : sexe génétique ou chromosomique (XX ou XY), sexe gonadique (ovaires ou testicules), sexe phénotypique (féminin ou masculin) et certainement aussi sexe psychologique qui fait qu'une personne se sent en adéquation avec son sexe, notamment phénotypique. Les discordances entre ces différents niveaux de définition du sexe entraînent tout un ensemble de pathologies regroupées sous le terme de DSD (*Disorders/Differences of Sex Development*) et leurs observations sont à la base des connaissances sur les facteurs génétiques causaux. Ces derniers peuvent être classés en facteurs « pro-testiculaires » et facteurs « pro-ovariens » et c'est leur expression respective, en quantité donnée et selon une chronologie bien établie, qui va conditionner la phase initiale du développement sexuel, à savoir la formation de la gonade suivant un processus dénommé *stricto sensu* « déterminisme gonadique ». Une fois la nature de la gonade établie, des sécrétions hormonales mettront en adéquation le sexe phénotypique avec cette dernière, c'est-à-dire feront évoluer le tractus génital et les organes génitaux externes au cours d'un processus dénommé « différenciation sexuelle ». Les gènes impliqués dans ces deux mécanismes sont loin d'être encore tous connus ce qui explique pourquoi seulement 50% des cas de DSD ont une origine génétique identifiée, les autres pouvant être en grande partie dus à des mutations touchant les séquences de régulation (Baetens et al., 2017).

Toute anomalie dans la relation causale existant entre le sexe génétique, le sexe gonadique et le sexe phénotypique est susceptible de s'accompagner, à la naissance, de malformations génitales qui rendront difficile, voire impossible, la déclaration du genre de l'enfant à l'État Civil. Cependant, en l'absence de telles malformations, d'authentiques cas de DSD pourront se manifester seulement à la puberté voire à l'âge adulte. L'étude de ces pathologies n'est donc pas du seul ressort de la pédiatrie ou de la chirurgie pédiatrique mais relève également de l'endocrinologie de l'adolescence et de la médecine de la reproduction. L'avis de généticiens cliniciens est également important car les DSD rentrent dans le cadre d'un grand nombre de syndromes géniques ou chromosomiques qu'il est fondamental de reconnaître pour en mesurer le risque de récurrence.

A. Développement sexuel

L'embryon humain est issu de la fécondation du gamète maternel, l'ovocyte et du gamète paternel, le spermatozoïde, établissant ainsi le « sexe génétique ». En effet, les gamètes parentaux contiennent le matériel génétique du futur embryon. Si le produit issu de la fécondation est constitué de deux chromosomes X, l'embryon sera de « sexe génétique » féminin. Et s'il est constitué d'un chromosome X et d'un chromosome Y, ce sera un embryon de « sexe génétique » masculin. La différenciation des gonades est déterminée par le contenu chromosomique de l'œuf. Communément, les embryons de « sexe génétique » féminin de formule chromosomique XX ont un développement ovarien alors que les embryons de « sexe génétique » masculin de formule chromosomique XY ont un déterminisme testiculaire. On introduit ici la définition de « sexe gonadique ». La troisième et dernière étape est le développement des voies génitales et des organes génitaux externes féminins ou masculins lorsque la gonade est fonctionnelle : on parle alors de « sexe phénotypique » correspondant au sexe identifié phénotypiquement pendant la grossesse grâce aux examens échographiques puis à la naissance.

1. Développement de la gonade

La première étape de la formation de l'appareil génital est le développement gonadique. Elle commence très précocement, dès la troisième semaine de développement chez l'embryon humain avec l'apparition d'une structure indifférenciée similaire chez les embryons de formule chromosomique XX et XY.

a) Gonade indifférenciée ou bi-potentielle

Une bonne partie des connaissances sur les gènes impliqués dans le déterminisme gonadique et dans la différenciation sexuelle, ainsi que sur leurs interactions, vient de l'étude des modèles murins mais il existe des différences interspécifiques notables qui font que les données tirées de ces modèles ne sont pas forcément applicables à l'espèce humaine. Dans cette dernière, ce sont donc surtout les observations de patients DSD qui permettent de faire avancer les connaissances mais la

compréhension de ces pathologies ne peut se faire qu'à la lumière des données de l'embryologie du système génital. Ce dernier évolue à partir d'un stade dit indifférencié où une gonade primitive se forme à la quatrième semaine de développement dans la région du mésonéphros à partir d'un bourgeonnement de l'épithélium de la cavité coelomique (crêtes génitales) envoyant des cordons dans le mésenchyme sous-jacent. Ceux-ci donneront naissance aux futures cellules de Sertoli du testicule ou de la granulosa de l'ovaire. Ces cordons vont être ensuite colonisés par des cellules germinales primordiales (PGC : *Primordial Germ Cells*) à la cinquième semaine de développement pour donner naissance à une gonade dite primordiale, ou indifférenciée, dont l'aspect histologique ne permet pas de dire s'il s'agit d'un futur ovaire ou d'un futur testicule. Les gènes impliqués dans la formation de cette gonade primitive sont souvent des gènes majeurs du développement, appartenant soit à la famille des gènes homéobox (*Lim-like homeodomain protein 9, Lhx9* ; *Empty spiracles homoeobox 2, Emx2* ; *Chromobox 2, Cbx2*), soit à celle des facteurs de transcription (*Wilms tumor 1, Wt1* ; *Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1, Nr5a1*, codant pour le facteur de stéroïdogénèse 1, SF1). L'implication de ces gènes a souvent été décrite chez la souris et peu chez l'Homme du fait du caractère létal des mutations les affectant qui s'accompagnent d'une absence de gonades mais souvent aussi d'une absence des reins ou des surrénales. Les modèles murins d'inactivation de ces gènes ont cependant été parfois corroborés par la pathologie humaine comme pour les gènes *EMX2*, *WT1* ou *NR5A1* avec, comme différence principale, le fait que les mutations décrites sont hétérozygotes, traduisant le caractère très dose-dépendant de l'action des gènes impliqués dans le déterminisme gonadique, et ce d'une façon générale (Lin and Achermann, 2008; Köhler et al., 2011; Piard et al., 2014).

L'évolution de la gonade indifférenciée est ensuite le résultat de l'action antagoniste de facteurs soit pro-testiculaires soit pro-ovariens, facteurs dont l'expression ne peut pas être concomitante. En effet, à l'instar d'une balance où le fait d'appuyer sur les deux plateaux en même temps ne produirait aucun mouvement, leur activation est asynchrone : en cas de formation d'un testicule, les premiers doivent s'exprimer avant que les seconds ne viennent les contrecarrer alors que, si le caryotype est XX, les facteurs pro-testiculaires ne seront pas activés et ceux pro-ovariens pourront alors s'exprimer librement. Cet asynchronisme suppose une régulation fine des gènes impliqués de façon à aboutir à une expression spatio-temporelle adéquate.

b) Développement testiculaire

L'apparition des testicules intervient précocement, dès la septième semaine de développement embryonnaire. Les cellules somatiques de la gonade bi-potentielle se différencient en cellules pré-Sertoliennes qui vont se polariser pour mettre en place des jonctions intercellulaires entraînant l'englobement des PGCs et l'apparition des cordons séminifères (Wilhelm et al., 2007). L'épithélium coelomique et le mésonéphros sont à l'origine des autres types cellulaires présents dans le testicule fœtal. L'épithélium coelomique va majoritairement faire augmenter le volume gonadique alors que le mésonéphros va mettre en place l'architecture du testicule (DeFalco et al., 2011; Karl and Capel, 1998). En effet, des cellules endothéliales provenant du mésonéphros vont migrer conduisant à compartimenter la gonade, donnant ainsi naissance aux cordons testiculaires et structurant la vascularisation testiculaire (Martineau et al., 1997).

Le mésonéphros va se différencier en cellules myoïdes périvitubulaires, qui, avec les cellules de Sertoli, vont permettre de mettre en place la membrane basale entourant les cordons testiculaires.

Enfin, les cellules de Leydig, dont l'origine embryologique reste incertaine – vraisemblablement du mésonéphros et de l'épithélium coelomique - sont responsables de la synthèse des hormones stéroïdiennes testiculaires qui initient la différenciation des voies génitales et des organes génitaux externes masculins (DeFalco et al., 2011; Karl and Capel, 1998).

c) Développement ovarien

Débutant plus tardivement que le développement testiculaire, le développement ovarien commence à partir de la huitième semaine de développement embryonnaire avec l'évanescence des cordons sexuels et la formation d'une deuxième lignée de cordons sexuels entourant les PGCs en cours de multiplication. A la douzième semaine de développement, deux zones dans l'ovaire sont reconnaissables : la zone corticale qui comprend les cordons sexuels et la zone médullaire constituée de tissus conjonctifs et de vaisseaux sanguins. A partir du quatrième mois de grossesse, le développement des vaisseaux depuis la médullaire vers la corticale conduit à fragmenter

les cordons sexuels en amas cellulaires qui vont entourer plusieurs PGCs. Ces dernières se différencient alors en ovogonies, se multipliant de façon synchrone. Les ovogonies vont débiter la première division de méiose et former les ovocytes I. La stimulation des ovocytes I permet la différenciation des cellules de soutien en cellules de la granulosa, qui s'unistratifient autour de l'ovocyte formant ainsi un follicule primordial. Ce processus de formation des follicules primordiaux entraîne une perte importante d'ovocytes : un tiers seulement va conduire à des follicules primordiaux (Pepling and Spradling, 2001). Le cycle de division des ovocytes se figent en prophase de première division de méiose jusqu'à la puberté. Le nombre maximal de follicules est à cinq mois de grossesse avec environ sept millions de follicules primordiaux. Cette réserve se réduit massivement jusqu'à la naissance où elle est évaluée entre un et deux millions.

2. Développement des voies génitales et des organes génitaux externes

Le développement des voies génitales et des organes génitaux externes, que ce soit pour le fœtus féminin ou masculin, est intimement associé au développement du rein et des voies excrétrices.

a) Stade indifférencié

Le caractère indifférencié de la gonade primitive est à mettre en rapport avec un double système canalaire qui se met en place, l'un à partir du système excréteur du mésonéphros (canal de Wolff) et l'autre à partir d'une invagination de l'épithélium de surface de la cavité coelomique qui va s'individualiser en un canal dit para-mésonéphrotique ou canal de Müller. Ces deux canaux seront ensuite à l'origine des futurs tractus génitaux, respectivement masculin et féminin. Leur évolution ultérieure dépendra de la nature de la gonade qui se mettra en place et des sécrétions hormonales qui en découleront.

La gonade et le tractus génital ne sont pas les seuls à évoluer à partir d'une structure commune aux deux sexes. La différenciation des organes génitaux

externes va elle aussi se faire à partir d'une formation identique, le sinus uro-génital qui représente l'ébauche primordiale à partir de laquelle évolueront les organes génitaux externes des deux sexes (Encha-Razavi and Escudier, 2008).

Les plis cloacaux fusionnent vers la sixième semaine pour former le tubercule génital (Figure 1). Le périnée est issu de la fusion du septum uro-rectal avec la membrane cloacale vers la septième semaine. La cavité du sinus uro-génital définitif s'étend à la surface du tubercule génital élargi pour former la gouttière urétrale qui se comble ensuite d'une plaque endodermique pour former la plaque urétrale plus ou moins longue selon le sexe. Dans les deux sexes, une excroissance épithéliale reste présente au sommet du tubercule génital.

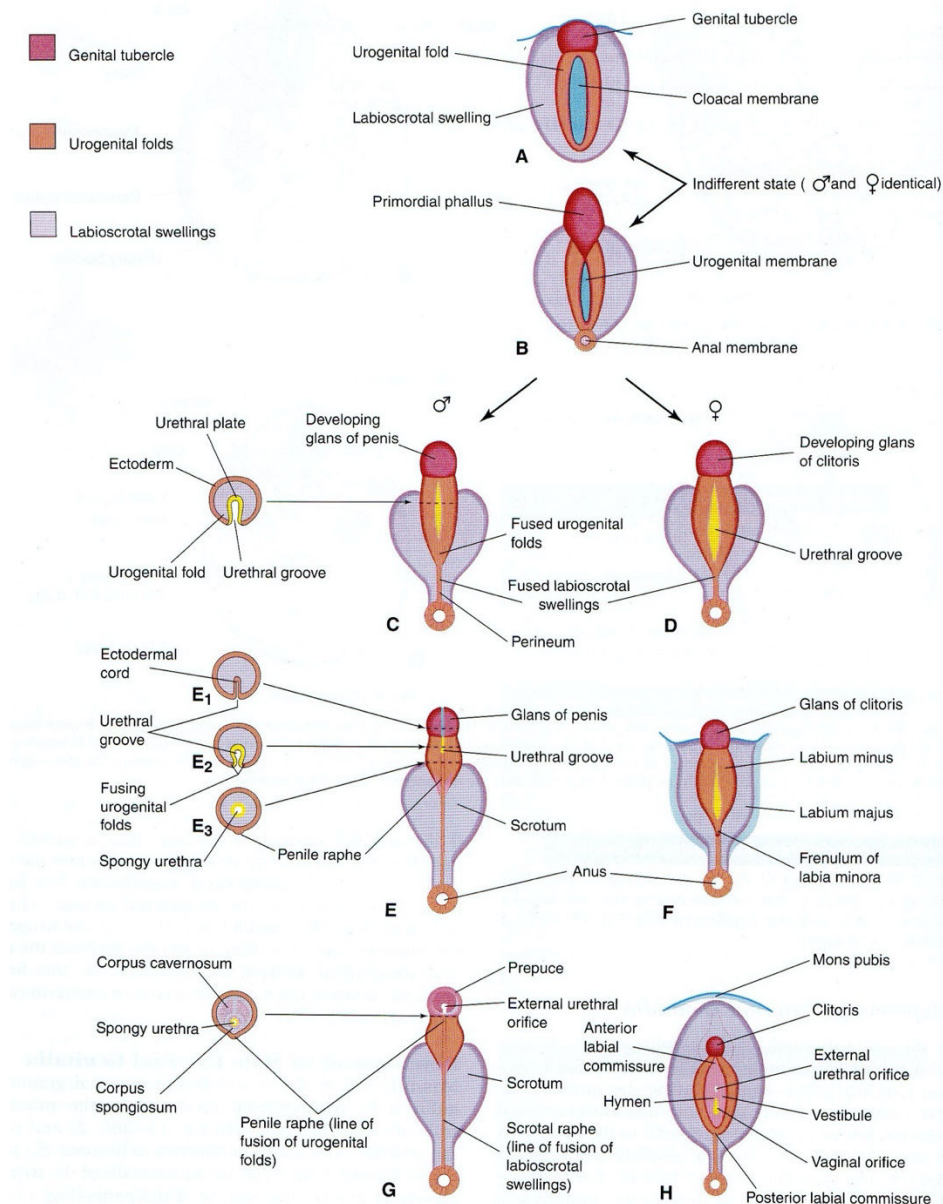


Figure 1. Développement des organes génitaux externes (Moore and Persaud, 2003).

A et B : schéma évolutif au stade indifférencié (4^{ème} à 7^{ème} semaine).

C, E et G : stades de développement des OGE masculins à 9, 11 et 12^{ème} semaine.

D, F et G : stades de développement des OGE féminins.

A gauche : illustration en coupe transverse de la formation urétrale.

Ces données d'embryologie sont d'une extrême importance pour interpréter la pathologie et comprendre, par exemple, pourquoi le phénotype est féminin avec un tractus génital conservé lorsque le testicule ne se forme pas, ou mal, (dysgénésie gonadique XY) et qu'il n'y a ni sécrétion d'androgènes ni production d'AMH (*Anti-Mullerian Hormone*) alors qu'il est féminin mais sans utérus en cas d'insensibilité aux androgènes.

b) Différenciation selon le sexe

Après des décennies de travaux d'embryologistes dans la première moitié du XX^{ème} siècle, ce sont les expériences d'Alfred Jost (1916-1991) qui ont permis de détailler le contrôle hormonal de l'évolution des organes génitaux, interne et externes, et de mettre en évidence la dualité des hormones testiculaires fœtales, testostérone et AMH (Jost, 1991). Bien avant la découverte des gènes impliqués dans le déterminisme gonadique, ces travaux ont généralisé l'idée que le sexe féminin se forme « par défaut », de façon « passive », si des facteurs masculinisants ne sont pas présents. Par sa sécrétion d'androgènes, un testicule permettra en effet le développement du canal de Wolff en épididyme et en canal déférent alors que, par la sécrétion d'hormone anti-Müllérienne ou AMH, il entraînera la disparition du canal de Müller. Dans le cas contraire, c'est-à-dire si un ovaire se forme, ce sont les canaux de Wolff qui disparaîtront alors que les canaux de Müller seront à l'origine d'une bonne partie du tractus génital féminin, trompes, utérus et partie supérieure du vagin. Il est à noter que le sinus uro-génital est également à l'origine de la partie basse du vagin grâce à un bourgeonnement de sa paroi postérieure en regard de la portion inférieure des canaux de Müller. Dès lors, toute anomalie dans la synthèse des androgènes ou dans leur réceptivité est susceptible d'altérer la masculinisation normale d'un fœtus XY et d'aboutir à une situation de DSD allant du simple défaut de virilisation à la réversion sexuelle complète. La caractéristique commune de ces dernières sera la disparition des structures Müllériennes, grâce à une sécrétion d'AMH conservée, avec un phénotype externe féminin mais un vagin borgne dont le développement sera limité à la prolifération tissulaire de la paroi postérieure du sinus uro-génital dont il est issu. A l'inverse, un défaut dans la synthèse d'AMH ou dans sa réceptivité se caractérisera par la persistance des structures Müllériennes chez un individu XY.

A partir de la septième semaine, les cellules de Leydig sécrètent de la testostérone. Par l'intermédiaire de sa forme réduite, la dihydrotestostérone (DHT), elle provoque l'allongement du tubercule génital, qui formera le pénis. A la fin du troisième mois, la fusion des replis génitaux est à l'origine de l'urètre membraneux et pénien. Les bourrelets labio-scrotaux fusionnent sur la ligne médiane pour former le scrotum. Au quatrième mois, la formation du méat urétral et de l'urètre balanique s'effectue à partir d'une ébauche ectodermique (Moore and Persaud, 2003). L'hypospadias du gland résulte donc probablement d'un défaut de développement ectodermique distal du méat urétral.

L'hypospadias péno-scrotal survient en l'absence de fusion des bourrelets labio-scrotaux et des plis urétraux.

Si ce processus de masculinisation ne se fait pas, l'évolution du sinus uro-génital se fera spontanément vers la formation d'organes génitaux externes de type féminin, et ce quelle que soit la nature de la gonade.

B. Facteurs génétiques impliqués dans le développement gonadique

Le développement gonadique dépend de la communication intercellulaire elle-même sous la dépendance de voies de signalisation et de facteurs de transcription qui modifient l'expression des gènes.

1. Gènes impliqués dans la formation de la gonade bi-potentielle

Chassot et al., en 2012, ont finement étudié la voie de signalisation WNT, tout particulièrement la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique sous l'action des deux ligands WNT4 (*Wnt family member 4*) et RSPO1 (*R-spondin 1*) (Chassot et al., 2012). En effet, les souris mâles et femelles génétiquement modifiées pour inactiver les gènes *Wnt4* et/ou *Rspo1* avaient alors une diminution de la prolifération cellulaire au niveau des crêtes génitales (Chassot et al., 2012). Ces deux ligands sont donc les principaux déterminants de la différenciation ovarienne.

En outre, les études chez des modèles murins et chez des patients porteurs d'anomalies du développement génital (ADG) – autre terme utilisé pour DSD ou ADS - ont conclu que certains gènes comme *WT1*, *NR5A1*, *Emx2*, *Lhx9*, *CBX2* ou encore *GATA4* (*GATA binding protein 4*) étaient indispensables à la différenciation de la gonade

primitive. Les gènes *WT1* et *NR5A1* seront détaillés dans le chapitre consacré aux gènes impliqués dans le déterminisme testiculaire.

a) *Emx2*

Le gène *Emx2* (*Empty spiracles homeobox 2*) permet de coder pour un facteur de transcription présent au niveau du système nerveux central mais aussi au niveau des cellules épithéliales de l'appareil urogénital (Pellegrini et al., 1997). Les souris *knock out Emx2^{-/-}* ont une absence totale de développement des voies urogénitales provenant du mésonéphros, tout particulièrement les reins, les gonades, les uretères et les voies génitales. Cela est lié à une réduction du nombre de cellules épithéliales migrant vers le mésenchyme vraisemblablement due à une anomalie de la polarisation et de migration (Kusaka et al., 2010). Cependant, la vessie et les glandes surrénales se développent normalement. Aucune mutation du gène *Emx2* n'a été publiée dans la littérature. De façon surprenante, un patient avec un caryotype 46,XY avait également une délétion du gène *EMX2* sans délétion du gène *FGFR2* (*fibroblast growth factor receptor 2*) : phénotypiquement, cet enfant avait une anomalie des organes génitaux externes associant hypospadias proximal, micropénis et cryptorchidie bilatérale. L'examen anatomo-pathologique des gonades retrouvait de rares tubules séminifères sans cellules de Sertoli ni spermatogonies (Piard et al., 2014).

b) *Lhx9*

Les souris *Lhx^{-/-}* présentent des anomalies de développement et de prolifération des cellules de soutien entraînant une absence de développement de la gonade bi-potentielle. En 2000, Birk et al. ont montré que les souris *Lhx^{-/-}* avaient une diminution de l'expression de SF1. En effet, le gène *Lhx9* code pour un facteur de transcription possédant deux domaines fonctionnels : un domaine de liaison à l'ADN et un domaine impliqué dans les interactions protéines-protéines. *In vitro*, la protéine LHX9 se lie directement au promoteur de *Nr5a1* pour permettre son activation, en présence ou non de *WT1* (Wilhelm, 2002). Ceci suggère donc que le gène *LHX9* agirait en amont du gène *NR5A1*. Bien que le gène *LHX9* semble jouer un rôle dans la formation de la gonade indifférenciée, aucune étude réalisée chez l'homme n'a mis en évidence son implication clinique (Lucas-Herald and Bashamboo, 2014).

c) **CBX2**

Le gène *CBX2* (*Chromobox homolog 2*) code pour une protéine appartenant au complexe multiprotéique Polycomb qui intervient, à travers le remodelage chromatinien et la modification des histones, dans le maintien des profils d'expression des gènes du développement. Le gène *Cbx2* permet le développement des crêtes génitales. La majorité des souris *Cbx2*^{-/-} meurt précocement et les souris mâles XY ont un phénotype féminin. Le volume ovarien des souris XX comparé aux souris WT est largement diminué. Les crêtes génitales se développent alors de façon retardée aussi bien chez les mâles que chez les femelles (Katoh-Fukui et al., 1998). En outre, l'expression du gène *Nr5a1* diminue chez les souris *Cbx2*^{-/-} suggérant son action dans la régulation de son expression. Enfin, le gène *Cbx2* serait aussi impliqué dans l'expression du gène *Sry* (*Sex-determining Region Y*) puisque le phénotype masculin peut être rétabli chez les souris XY *Cbx2*^{-/-} lorsqu'elles sont croisées avec des souris surexprimant les gènes *Sry* ou *Sox9* (*SRY-related HMG-box 9*) (Katoh-Fukui et al., 2012). Ce gène semble être aussi impliqué dans le développement testiculaire chez l'homme puisqu'un cas report présente le cas d'une patiente avec un développement ovarien et un caryotype 46,XY par la présence d'une double mutation hétérozygote dans le gène *CBX2* (Biaison-Lauber et al., 2009).

d) **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. Ce gène a un rôle prépondérant dans le développement cardiaque mais aussi dans la différenciation gonadique. Son expression est, en effet, détectée précocement dans la gonade bi-potentielle chez les souris XX et XY au niveau des cellules de soutien. Curieusement, il ne s'exprime pas dans les PGCs (Viger et al., 1998). Dans le modèle murin, l'expression progressive du gène *GATA4* s'effectue depuis la partie antérieure de l'épithélium coelomique vers la partie postérieure, immédiatement avant l'épaississement de cet épithélium. En outre, le *knock out* du gène *Gata4* est létal dans le modèle murin avant le développement des crêtes génitales. Un modèle de *KO* conditionnel a démontré l'absence d'initiation du développement des crêtes génitales due à l'absence de prolifération de l'épithélium coelomique qui se maintient sous forme monostratifiée

(Hu et al., 2013; Molkenin et al., 1997). Du point de vue moléculaire, l'absence d'expression de *Lhx9* et *Nr5a1* était noté. La protéine GATA4 est ainsi indispensable au développement de la gonade bi-potentielle aussi bien chez les souris XX que les souris XY. Elle joue aussi un rôle majeur dans le développement testiculaire puisqu'avec son cofacteur ZFPM2 (*zinc finger protein, FOG family member 2*; anciennement FOG2 (*Friend of GATA2*)), l'expression de *SRY* est possible.

2. Gènes impliqués dans le déterminisme testiculaire

Les gènes impliqués dans le déterminisme testiculaire sont nombreux et, pour beaucoup d'entre eux, leur effet n'a été décrit que dans les modèles animaux (Tableau 1). Néanmoins, chez l'homme, certains sont responsables de syndromes cliniques relativement bien identifiés et les anomalies les touchant expliquent environ la moitié des cas de DSD XY, les autres pouvant être dus à des mutations dans des régions régulatrices aboutissant à un défaut dans le niveau ou la temporalité de leur expression (Baetens et al., 2017).

Gènes impliqués dans les 46,XY DSD

Gène	Locus chromosomique	Mode de transmission	Phénotype DSD et associé
AMH	19p13.3	AR	Persistance des canaux de Müller
AMHR2	12q13.13	AR	Persistance des canaux de Müller
AR	Xq12	XL	CAIS ou PAIS
ARX	Xp22.13	XL	DG (lissencéphalie, épilepsie, DI)
ATRX	Xq13.3	XL	DG, absence de structures Müllériennes (dysmorphie, DI, α -thalassémie)
BMP4	14q22.2	AD	Hypospadias
CBX2	17q25	AR	DG XY complète
DHH	12q13.1	AR	DG complète ou partielle (neuropathie mini-fasciculaire)
DMRT1	9p24.3	AD	DG (syndrome chromosomique 9p-)
ESR2	14q23	?	DG, OGE féminins (Dysmorphie, anomalies oculaires, atrésie anale)
FGFR2	10q26.13	AD	DG complète (craniosynostose)
GATA4	8p23	AD	DG, OGE ambigu (malformations cardiaques, hernie diaphragmatique)
HHAT	1q32.2	AR	DG complète (nanisme, anomalies squelettiques, microcéphalie, hypoplasie cérébelleuse, anomalies faciales)
HOXA13	7p15.2	AD	Hypospadias, anomalies Müllériennes (hand-foot genital syndrome)
INSL3	19p13.11	AD	Cryptorchidie
MAMLD1	Xq28	XL	Hypospadias et micropénis (myopathie myotubulaire)
MAP3K1	5q11.2	AD	DG complète ou partielle
NR0B1	Xq21.3	XL	DG, hypogonadisme hypogonadotrope (hypoplasie surrénalienne, fentes labio-palatines, DI)
NR5A1	9q33	AD	DG, hypospadias, micropénis, cryptorchidie (insuffisance surrénalienne)
RXFP2	13q13.1	AD	Cryptorchidie
SOX8	16p13.3	AD	DG (infertilité masculine, insuffisance ovarienne prématurée)
SOX9	17q24-q25	AD	DG (dysplasie campomélique, séquence de Pierre Robin)
SRD5A2	2p23.1	AR	Défaut de virilisation, masculinisation pubertaire
SRY	Yp11.3	YL	DG complète
TSPYL1	6q22.1	AR	DG, mort subite du nourrisson
WT1	11p13	AD	DG, syndromes WAGR, Denys-Drash, Frasier
WWOX	16q23	AD	DG, OGE ambigu
ZFPM2	8q22.3	AD	DG, OGE ambigu (anomalies cardiaques, hernie diaphragmatique)
ZNRF3	22q12.1	?	DG complète ou partielle

Tableau 1. Tableau récapitulatif des gènes impliqués dans le déterminisme testiculaire (Baetens et al., 2019).

DG : dysgénésie gonadique ; OGE : organes génitaux externes ; DI : déficience intellectuelle ; AR : autosomique récessif ; AD : autosomique dominant ; XL : lié à l'X ; YL : lié à l'Y.

a) **SRY**

Le sexe génétique étant établi à la fécondation par la nature, X ou Y, du spermatozoïde fécondant, il apparaît clairement que c'est le chromosome Y qui, chez les mammifères, porte un facteur responsable du déterminisme testiculaire et ce quel que soit le nombre de chromosomes X : un caryotype constitué de deux chromosomes X comme chez la femme mais avec un chromosome Y, comme on peut le voir dans le syndrome de Klinefelter, aboutit à la formation normale du testicule et à un phénotype masculin.

Le facteur de déterminisme testiculaire, ou TDF (*Testis Determining Factor*) a été identifié en 1990 comme étant un gène dénommé *SRY* (*Sex-determining Region Y*) codant pour un facteur de transcription d'expression testiculaire et très conservé au cours de l'évolution (Sinclair et al., 1990). Il est situé à l'extrémité du bras court du chromosome Y, près de la région de stricte homologie avec le chromosome X (région PAR1 : *Pseudo-Autosomal Region 1*), région témoin de l'origine évolutive commune des chromosomes X et Y à partir d'une paire d'autosome reptilien. Cette localisation est d'importance du fait des recombinaisons génétiques qui surviennent dans la région PAR1 à la méiose et qui, accidentellement, peuvent déborder sur le chromosome Y et faire passer le gène *SRY* sur le chromosome X (Figure 2).

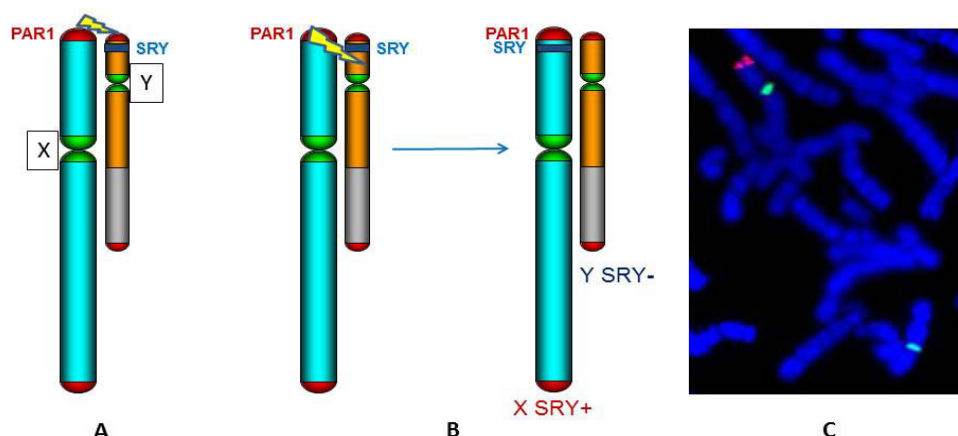


Figure 2. Schéma montrant comment un chromosome Y peut perdre le gène *SRY* au profit d'un chromosome X.

A : en situation normale, un appariement à la méiose et une recombinaison génétique ont lieu dans la région PAR1, région strictement identique entre l'X et l'Y et située à l'extrémité de leur bras court. Ces recombinaisons n'ont pas d'effet sur la structure des deux chromosomes.

B : en cas de recombinaison génétique anormale ayant lieu au-delà de PAR1, le gène *SRY* passe sur le chromosome X avec, comme conséquence, la formation de deux spermatozoïdes anormaux, l'un X, *SRY+* et l'autre Y, *SRY-*. En cas de fécondation par le premier, le résultat sera un homme XX, *SRY+*, alors que si c'est le deuxième qui féconde, ça sera une dysgénésie gonadique pure chez une femme XY, *SRY-*.

C : image en FISH de deux chromosomes X (sondes vertes) dont l'un porte le gène *SRY* (sonde rouge) à l'extrémité de son bras court.

Il s'ensuit alors la formation de deux spermatozoïdes anormaux, l'un Y-*SRY-* et l'autre X-*SRY+* et c'est justement l'étude de femmes XY ne possédant plus le gène *SRY* sur leur chromosome Y, et d'hommes XX l'ayant récupéré sur l'un de leurs chromosomes X, qui est à l'origine de la découverte de ce gène (Sinclair et al., 1990).

S'agissant de la translocation anormale d'une région chromosomique entière du chromosome Y au chromosome X, région pouvant contenir un autre gène de déterminisme testiculaire plus important encore que le gène *SRY*, c'est la constatation de mutations ponctuelles du gène *SRY* chez des femmes XY présentant une dysgénésie gonadique pure, c'est-à-dire des gonades réduites à l'état de bandelettes fibreuses (*streak gonads*), qui vint apporter une preuve quasi formelle de l'implication de ce gène dans l'initiation du déterminisme testiculaire (Berta et al., 1990). Des observations ultérieures montreront que la plupart des mutations du gène *SRY* touchent une région centrale très conservée, ou boîte HMG (*High Mobility Group*) responsable de la liaison de

la protéine SRY à l'ADN. La preuve absolue du rôle du gène *SRY* dans le déterminisme testiculaire viendra ensuite de la réalisation de souris transgéniques où les individus XX exprimant un transgène de 14,6 Kb ne contenant que le gène *Sry* se développent comme des mâles, affirmant ainsi que, chez les mammifères, ce gène représente le principe irréductible permettant à lui seul de provoquer la transformation de la gonade indifférenciée en testicule (Koopman et al., 1991). La régulation transcriptionnelle du gène *Sry* implique des séquences obligatoirement contenues dans les 14,6 Kb de ce transgène, séquences sur lesquelles vont se fixer des facteurs de régulation préalablement présents dans les cellules des cordons de la gonade primitive, même si celles-ci ont un caryotype XX.

Chez la souris, ces facteurs commencent à être identifiés. On retrouve des facteurs de transcription largement exprimés dans ces cordons gonadiques tels que *GATA4* (*GATA binding protein 4*) et le cofacteur *FOG2* (*Friend Of GATA2*) ou *WT1* (*Wilms Tumor 1*) ou encore le récepteur nucléaire *SF1* (*Steroidogenic Factor 1*) (Larney et al., 2014; Nef et al., 2019; Tevosian et al., 2002). L'interaction du gène *Sry* avec ces facteurs entraîne l'expression de la protéine SRY qui, chez la souris, est très transitoire, débutant à 10,5 dpc (*days post-coitum*) pour atteindre un pic à 11,5 dpc et s'éteindre à 12,5 dpc (Hacker et al., 1995). De plus, elle n'est pas homogène, débutant dans la partie centrale et antérieure pour diffuser ensuite vers les pôles et la partie caudale (Bullejos and Koopman, 2001).

Chez l'Homme, le gène *SRY* est le premier à s'exprimer dans la future gonade mâle à la sixième semaine de développement dans les cellules qui donneront ensuite les cellules de Sertoli. L'expression du gène *SRY* débute à J41 pour arriver à un maximum à J44 et ensuite décliner jusqu'à atteindre un niveau de base à J60 sans toutefois disparaître (Mamsen et al., 2017). Malgré des différences sensibles entre les modèles murins et humains concernant le déterminisme gonadique, il est probable que l'expression du gène *SRY* ne soit pas non plus homogène dans la gonade primitive chez l'homme et que cela explique la répartition particulière de tissus de nature différente que l'on peut observer dans certaines dysgénésies gonadiques où persiste du tissu testiculaire ou dans les ovotestis.

De plus, l'expression du gène *SRY* doit être suffisamment importante pour que l'ensemble de la gonade primitive bascule dans la voie testiculaire. Dans les

mosaïques 45,X/46,XY (dysgénésies gonadiques mixtes), si le pourcentage de cellules de Sertoli Y positives n'atteint pas un seuil suffisant, de l'ordre de 20%, le déterminisme testiculaire ne s'enclenche pas et la gonade évolue vers la dysgénésie. Le phénotype est alors féminin, proche d'un syndrome de Turner.

L'ensemble des facteurs impliqués dans la régulation de l'expression de *SRY* est rapporté dans la Figure 3.

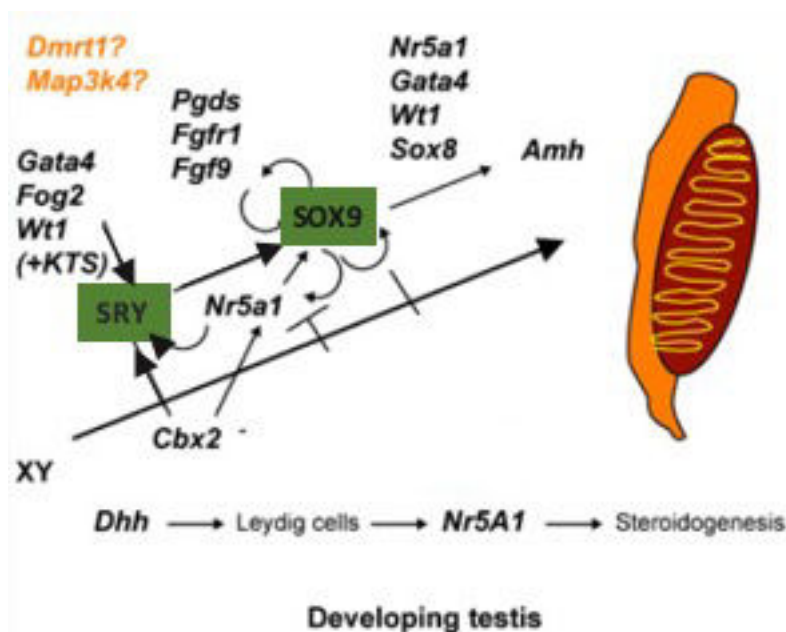


Figure 3. Aperçu des facteurs impliqués dans le développement testiculaire (Eggers and Sinclair, 2012).

b) *SOX9*

La protéine *SOX9* est un facteur de transcription de la famille *SRY-related HMG box* (*SOX*) dont il existe une vingtaine de membres regroupés en huit classes dont la classe E qui comprend, outre *SOX9*, *SOX8* et *SOX10* (Gonen and Lovell-Badge, 2019). Elle peut se comporter soit comme un activateur transcriptionnel soit comme un répresseur et ce dans de multiples tissus grâce à des séquences régulatrices (*promoters* et *enhancers*) spécifiques. Son implication dans le déterminisme gonadique a ainsi été établie par l'observation de cas de délétions ou de mutations hétérozygotes du gène *SOX9* chez des individus présentant des malformations squelettiques graves, ou dysplasie campomélique, associées dans deux tiers des cas à

des 46,XY DSD, c'est-à-dire des individus à caryotype XY mais à phénotype féminin ou ambigu (Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994).

Le rôle principal de SRY est d'activer le gène *SOX9* : l'expression de la protéine *SOX9* doit alors être massive et la plus rapide possible afin d'enclencher de façon irréversible la voie de déterminisme testiculaire à travers toute une série d'activation de gènes « pro-testiculaires » et de répression d'autres gènes « anti-testiculaires ou pro-ovariens » (Sekido et al., 2004). Cette activation se fait par la fixation de la protéine SRY associée à SF1, au moins chez la souris, sur une région régulatrice de 3,2 Kb (*enhancer*) située à 10-13 Kb en amont du gène *Sox9*, dénommée TES (*Testis-specific Enhancer of Sox9*), et plus particulièrement sur une séquence appelée TESCO (TES Core) (Gonen and Lovell-Badge, 2019; Sekido and Lovell-Badge, 2008). Cette dernière a également la propriété de fixer la protéine *SOX9* elle-même et de constituer ainsi une boucle de régulation positive où la protéine active son propre gène pour en accélérer l'expression.

Chez la souris, des délétions ciblées de TES ou de TESCO n'entraînent pas de développement femelle chez les individus XY ce qui suggère l'existence d'autres régions régulatrices. Celles-ci ont été mises en évidence en pathologie humaine (femmes XY ou hommes XX) par l'observation de délétions ou de duplications d'une région très éloignée (500-600 Kb) en amont du gène *SOX9*, région dénommée RevSex, qui renferme plusieurs enhancers dont l'un [Enh13/eSR-A (*Sex Reversal Enhancer-A*)] contient des sites de fixation à plusieurs facteurs de transcription comme la protéine *SOX9* elle-même et SF1 (Croft et al., 2018). Il est notable que cette région chromosomique en amont de *SOX9* est un bon exemple de l'organisation du génome en domaines d'association topologique, ou TADs (*Topological Association Domains*) dont l'étude en génétique est en plein développement.

Une fois activé, le gène *SOX9* doit maintenir un niveau d'expression suffisant pour permettre le développement normal du testicule. De nouvelles boucles de régulation positive se mettent rapidement en place comme la stimulation du gène *Sox9* chez la souris par la prostaglandine D2 (PGD2) ou par le facteur de croissance FGF9 (*Fibroblast Growth Factor 9*) et du récepteur FGFR2 dont le rôle est double : entretenir l'expression de *Sox9* mais aussi inhiber les facteurs pro-ovariens qui pourraient commencer à se manifester (Kim et al., 2006; Moniot et al., 2009).

Les gènes « cibles », dont la protéine SOX9 module soit la transcription soit la maturation des transcrits au niveau gonadique, comprennent la plupart des gènes impliqués dans le déterminisme sexuel ce qui fait du gène *Sox9/SOX9* le gène majeur du développement testiculaire. Malgré des différences interspécifiques importantes, les régions génomiques liées à la protéine SOX9 sont logiquement enrichies en motif de liaison à SOX9 mais aussi à d'autres protéines impliquées dans le déterminisme testiculaire comme GATA4 ou DMRT1 ce qui génère une véritable « signature génomique Sertolienne » caractérisant les cellules de Sertoli fœtales (Rahmoun et al., 2017).

c) *NR5A1*

Initialement décrit comme un régulateur majeur de la stéroïdogénèse, la protéine SF1, codée par le gène *NR5A1*, possède en fait des rôles variés mais tous liés au développement et à la fonction gonadique, mâle et femelle. SF1 fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Sa structure comprend une partie N-terminal permettant la liaison, de façon monomérique, à l'ADN et une partie C-terminal de liaison à un ligand, les deux étant séparées par une région charnière. Des expériences de modélisations cellulaires suggèrent que, comme chez la souris, la protéine SF1 se fixe avec SRY sur l'équivalent humain de TES pour activer et maintenir l'expression du gène *SOX9* (Knower et al., 2011).

Chez la souris, des délétions ciblées du gène *NR5A1* associent une insuffisance surrénalienne et une dysgénésie gonadique XY avec persistance des structures Müllériennes. Un tel phénotype a été rarement décrit dans l'espèce humaine alors, qu'au contraire, les cas de dysgénésies gonadiques XY isolées dues à des mutations hétérozygotes du gène *NR5A1* sont particulièrement fréquents et représenteraient 10 à 20% des 46,XY DSD, le tableau clinique le plus évocateur étant celui d'enfants présentant des degrés variables de dysgénésie testiculaire, avec ou sans dérivés Müllériens associés un défaut évident d'action des androgènes sous la forme de malformations génitales (fusion postérieure de grandes lèvres, scrotum bifide, hypospadias, micropénis ou encore cryptorchidie) (Suntharalingham et al., 2015).

Le caractère pléiotrope des mutations du gène *NR5A1* est illustré par leur implication, toujours à l'état hétérozygote, dans d'autres pathologies touchant le

fonctionnement gonadique plutôt que son développement. Elles ont été ainsi incriminées dans l'hypofertilité masculine et dans l'insuffisance ovarienne prématurée (Bashamboo et al., 2010; Lourenço et al., 2009).

Le gène *NR5A1* (*SF1*), codant pour le *steroidogenic factor 1*, est situé en 9q33. Il comporte six exons codant pour une protéine de 461 acides aminés et est muté chez 3/60 garçons présentant un hypospadias péno-scrotal (Ferraz-de-Souza et al., 2011; Köhler et al., 2009; Lin and Achermann, 2008) (Figure 4).

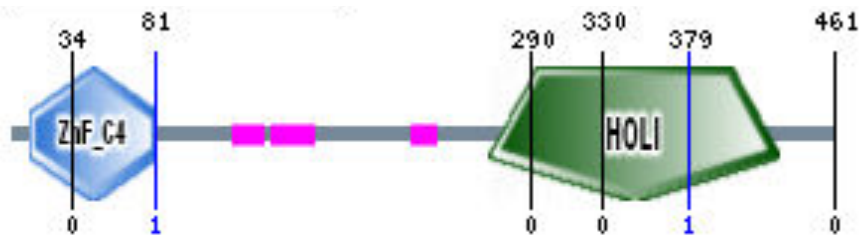


Figure 4. Représentation schématique de la protéine NR5A1.

Résidus 10-81 : domaine à doigt de zinc des récepteurs aux hormones ; résidus 267-430 : domaine de liaison du ligand des récepteurs aux hormones.

Il intervient dans le déterminisme testiculaire (Figure 5). Les mutations hétérozygotes sont responsables de phénotypes très variables allant de l'insuffisance surrénalienne isolée à la dysgénésie gonadique pure à caryotype XY en passant par l'insuffisance ovarienne prématurée.

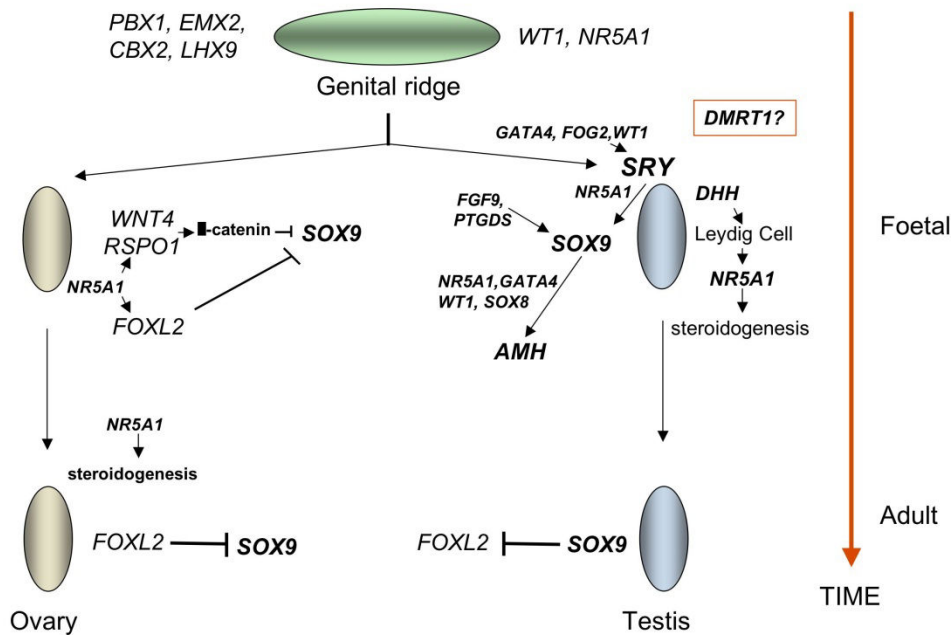


Figure 5. Implication du gène *NR5A1/SF1* dans le déterminisme testiculaire.

d) *WT1*

Découvert à partir de patients présentant un syndrome WAGR (tumeur de Wilms, aniridie, malformations génito-urinaires, retard mental), le gène *WT1* joue un rôle majeur dans le développement des reins et dans celui de la gonade à un stade très précoce en stabilisant l'ARN messager du gène *SRY* (Köhler et al., 2011). Exprimé sous la forme de deux transcrits différant par la présence ou non de trois acides aminés (lysine, thréonine, sérine), les formes -KTS et +KTS, il est impliqué dans deux syndromes associant anomalie du développement sexuel et atteinte rénale, le syndrome de Denys Drash et celui de Frasier. Dans le premier, des mutations hétérozygotes du gène *WT1* entraînent des dysgénésies gonadiques complètes ou partielles chez les individus XY avec une atteinte rénale rapide due à une sclérose mésangiale diffuse et un risque important de néphroblastome ou tumeur de Wilms. Dans le syndrome de Frasier, une anomalie dans la maturation de l'ARN messager aboutit à un déséquilibre dans les isoformes -KTS et +KTS : les individus XY atteints présentent également une dysgénésie gonadique complète ou partielle mais une atteinte rénale plus tardive par sclérose glomérulaire et un risque de néphroblastome moindre. Par contre, ils ont un risque important de gonadoblastome (Ezaki et al., 2015).

e) **NR0B1**

Situé sur le bras court du chromosome X, le gène *NR0B1* (*nuclear receptor subfamily 0 group B, member 1*) code pour la protéine DAX1 (*dosage sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, X chromosome gene 1*). Ce gène a été identifié initialement chez des patients qui présentaient des DSD. En effet, les duplications du gène *NR0B1* chez des sujets 46,XY sont à l'origine d'une dysgénésie gonadique avec phénotype féminin (Bardoni et al., 1994). A l'inverse, les mutations ou les délétions de ce gène sont responsables d'une hypoplasie congénitale des surrénales (Reutens et al., 1999). Chez la souris, il a été montré que le profil d'expression du gène *NR0B1* était similaire à celui du gène *NR5A1*, avec un léger décalage dans le temps (Ikeda et al., 1996). Le gène *NR0B1* est exprimé dans les deux sexes au moment du développement de la gonade primitive puis son expression persiste dans la gonade masculine alors qu'elle s'éteint dans l'ovaire en développement. Chez l'Homme, les observations suggèrent que la protéine DAX1 empêche l'activité de la protéine SF1 en inhibant sa fixation sur *Tesco* (Ludbrook et al., 2012; Nachtigal et al., 1998). Cependant, d'autres études retrouvent des anomalies du déterminisme testiculaire chez des souris XY déficientes pour le gène *NR0B1* suggérant un rôle pro-testiculaire (Meeks et al., 2003). Ceci est également retrouvé chez les patients ayant une mutation du gène *NR0B1*. En effet, ces patients ont un développement gonadique mais une désorganisation des cordons testiculaires et un hypogonadisme hypogonadotrope sont notés (Muscatelli et al., 1994). Afin d'expliquer qu'un défaut ou qu'un excès de la protéine DAX1 conduit quasiment à des conséquences similaires, Ludbrook et Harvey ont modélisé une voie de signalisation où l'action pro-testiculaire de DAX1 s'activerait dans une certaine gamme de concentration et, qu'en dehors de ces limites, un effet négatif sur le développement testiculaire serait présent (Ludbrook and Harley, 2004). Au total, le rôle du gène *NR0B1* reste encore à être éclairci dans le développement testiculaire (Figure 6).

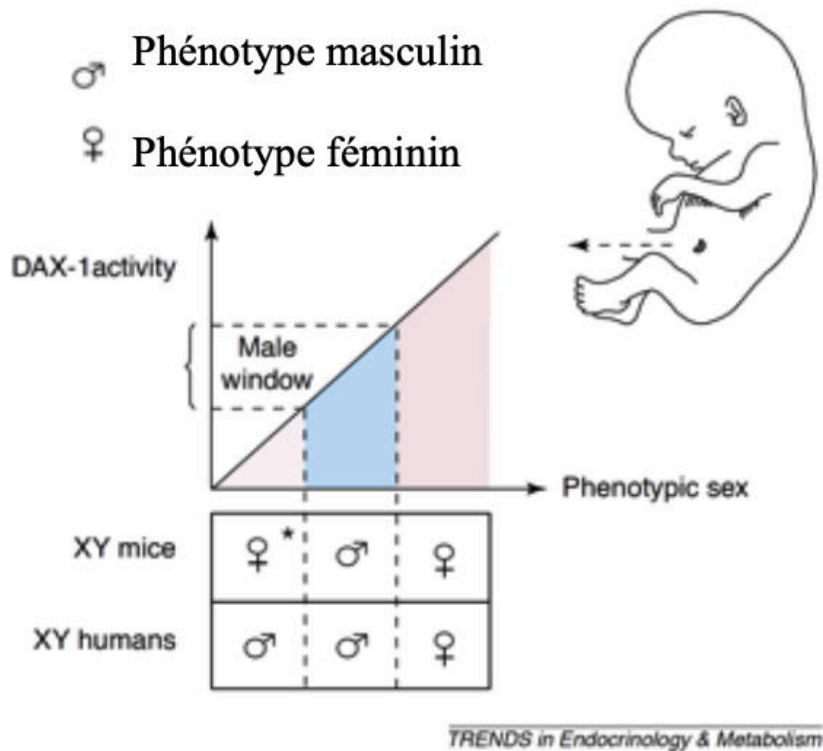


Figure 6. Modèle de l'activité pro-testiculaire de DAX1 en fonction de la gamme de concentration (Ludbrook and Harley, 2004).

f) *DMRT1*

Outre un syndrome malformatif sévère, ou syndrome d'Afi, 70% des nouveaux nés XY porteurs d'une délétion terminale du bras court d'un chromosome 9 présentent des anomalies du développement sexuel allant de la dysgénésie gonadique complète au simple hypospadias. La particularité de cette région chromosomique est de contenir le cluster des gènes *DMRT1, 2 et 3* (*Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor*) dont la perte d'un ou plusieurs exemplaires serait à l'origine des anomalies du développement sexuel observées dans les délétions 9p. L'expression du gène *DMRT1* notamment a lieu dans les crêtes génitales dans les deux sexes mais, chez la souris, devient limitée au testicule à 14,5 dpc c'est-à-dire à un moment où le déterminisme testiculaire est déjà enclenché de façon irréversible. Le rôle principal de *DMRT1* serait donc de maintenir le développement du testicule, et ce, au-delà du stade foetal jusqu'à la gonade adulte : l'inactivation conditionnelle du gène *Dmrt1* chez la souris mâle adulte reprogramme en effet les cellules de Sertoli en cellules de la granulosa ovariennes, suggérant que l'opposition entre les facteurs pro-testiculaires et pro-ovariens n'est pas

limitée à la période du déterminisme gonadique mais qu'elle a lieu toute la vie (Huang et al., 2017; Matson et al., 2011). Des résultats similaires ont été rapportés chez l'homme sur un modèle de cultures *in vitro* de testicules fœtaux : l'inactivation du gène *DMRT1* par des microARNs génère des zones de dysgénésie, dans lesquelles s'expriment des facteurs pro-ovariens, ce qui suggère aussi une trans-différenciation des cellules de Sertoli en cellules de la granulosa (Macdonald et al., 2018).

g) *MAP3K1*

L'importance des gènes impliqués dans les grandes voies de transduction du signal, par opposition à ceux codant pour des facteurs de transcription ou des récepteurs, a été soulignée par des analyses de liaisons faites dans deux familles présentant de multiples cas de DSD sur plusieurs générations, analyses qui ont abouti à l'identification d'un gène codant pour la kinase *MAP3K1* (MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Pearlman et al., 2010). Dans ces familles, la sévérité de l'atteinte des individus XY allait de la dysgénésie gonadique complète pour une mutation à un phénotype plus variable pour l'autre, associant des cas de dysgénésies gonadiques complètes ou partielles à d'autres ne présentant qu'un hypospadias ou un micropénis avec une cryptorchidie. Si les mutations du gène *MAP3K1* représentent une cause particulièrement fréquente de DSD, leur caractère hétérozygote chez les sujets atteints, et le fait que les souris *KO* pour ce gène ont un développement testiculaire normal, montrent que le gène *MAP3K1* n'est pas un gène de déterminisme testiculaire au sens strict. Ces mutations agissent par un gain de fonction en augmentant la phosphorylation d'un certain nombre de protéines cibles avec, comme conséquence, le déplacement de l'équilibre entre les facteurs pro et anti-testiculaires vers les seconds (Loke et al., 2014). D'autres kinases de la voie MAP, comme *MAP3K4*, jouent un rôle direct dans le déterminisme testiculaire au moins chez la souris où la mutation récessive *boygirl* (*byg*) entraîne systématiquement une réversion sexuelle chez les individus XY par défaut d'activation du gène *Sox9*, les mutations homozygotes chez l'homme étant très probablement létales (Bogani et al., 2009).

3. Gènes impliqués dans le déterminisme ovarien

Du fait de l'absence d'un déterminant génétique initial comme le gène *SRY* pour le testicule, le développement ovarien a longtemps été considéré comme un processus « passif », impression renforcée par ce qui se passe au niveau des organes génitaux internes et externes où l'absence de facteur masculinisant, *i.e.* la testostérone, oriente effectivement le développement vers un aspect féminin. En ce qui concerne la gonade cependant, si des déterminants ovariens ne rentrent pas en jeu, celle-ci évolue inexorablement vers la dysgénésie et un aspect résiduel de bandelettes fibreuses ou « *streak gonads* ». Le développement ovarien normal est donc également sous le contrôle d'un certain nombre de gènes mais dont l'étude n'est pas aussi poussée que pour les gènes impliqués dans le déterminisme testiculaire (Tableau 2).

Gènes impliqués dans les 46,XX DSD			
Gène	Locus chromosomique	Mode de transmission	Phénotype DSD et associé
BRCA2	13q13.1	?	Dysgénésie ovarienne, aménorrhée primaire, hypogonadisme hypergonadotrope (microcéphalie, taches café-au-lait, leucémie aigue myélocytaire)
CYP21A2	6p21.33	AR	Virilisation des OGE (insuffisance surrénalienne)
ESR2	14q23	?	Dysgénésie ovarienne, aménorrhée primaire
FSHR	2p16.3	AR	Dysgénésie ovarienne hypergonadotrope (insuffisance ovarienne prématurée, infertilité masculine)
LHX1	17q12	AD	Aplasie Müllérienne
NR2F2	15q26.2	?	Dysgénésie ovarienne, ovotestis, OGE ambigu (malformations cardiaques)
NR5A1	9q33	AD	46,XX DSD testiculaire, 46,XX ovotestis (insuffisance ovarienne prématurée)
NUP107	12q15	AR	Dysgénésie ovarienne, absence de puberté (syndrome néphrotique)
PSMC3IP	17q21.2	AR	Dysgénésie ovarienne
RSP01	1p34.3	AR	46,XX DSD testiculaire (hyperkératose palmo-plantaire)
SOX3	Xq27.1	XL	46,XX DSD testiculaire (DI, hypopituitarisme)
SOX9	17q24-q25	AD	46,XX DSD testiculaire
SOX10	22q13.1	AD	46,XX DSD testiculaire, hypospadias
SRY	Yp11.3	YL	46,XX DSD testiculaire, 46,XX ovotestis
WNT4	1p36.12	AD/AR	Aplasie Müllérienne, hyperandrogénie, réversion sexuelle (syndrome SERKAL)
WT1	11p13	AD	Dysgénésie ovarienne (syndrome néphrotique)
WWOX	16q23	AD	Dysgénésie ovarienne

Tableau 2. Tableau récapitulatif des gènes impliqués dans le déterminisme ovarien (Baetens et al., 2019).

DG : dysgénésie gonadique ; OGE : organes génitaux externes ; DI : déficience intellectuelle ; AR : autosomique récessif ; AD : autosomique dominant ; XL : lié à l'X ; YL : lié à l'Y.

a) **WNT-4, R-Spondin1 et la voie de la β -caténine**

La β -caténine, codée par le gène *CTNNB1*, représente une des voies de signalisation intracellulaire les mieux conservées au cours de l'évolution. Sa stabilisation à l'intérieur de la cellule passe par sa liaison avec des protéines de la famille WNT (*Wingless related-MMTV Integration site*) ce qui lui permet alors d'agir comme un co-activateur transcriptionnel. Parmi ces protéines, la protéine WNT-4 joue un rôle majeur dans le développement ovarien : exprimé dans le mésonéphros et les crêtes génitales, le gène *Wnt-4* murin est ensuite réprimé lorsque la gonade en formation est un testicule. A la naissance, les souris *KO Wnt-4^{-/-}* mâles ont un phénotype génital normal alors que les femelles sont masculinisées avec des gonades qui ressemblent à des testicules, des

canaux de Wolff qui restent développés et une absence de canaux de Müller mais sans virilisation des organes génitaux externes (Vainio et al., 1999).

Chez l'Homme, la duplication de la région chromosomique 1p31-p35 contenant le gène *WNT-4* entraîne une réversion sexuelle chez un individu XY par hyper-activation du gène *NR0B1* (*DAX1*) mais la recherche de mutations homozygotes chez des sujets XX masculinisés est restée négative, probablement en raison de leur effet létal (Jordan et al., 2001). Par contre, des mutations hétérozygotes ont été décrites chez des sujets de sexe féminin atteints du syndrome de Rokitansky, ou agénésie Müllérienne complète, et présentant des signes d'hyperandrogénie (Biaison-Lauber et al., 2004).

Parmi les activateurs de la voie WNT/ β -caténine, on retrouve les protéines de la famille des R-Spondines (RSPO) dont les quatre membres jouent des rôles pléiotropes importants lors de l'embryogenèse, le développement et la tumorigenèse. Chez la souris KO pour le gène de la RSPO-1, à 12,5 dpc, l'expression de *Wnt-4* est abolie alors que celle du gène *RSPO-1* ne l'est pas chez les souris *Wnt-4*^{-/-}, ce qui suggère que la protéine RSPO-1 est un activateur direct du gène *Wnt-4* et du développement ovarien à travers la voie de la β -caténine. Ceci est illustré chez l'Homme par l'observation d'individus XX porteurs de mutations homozygotes du gène *RSPO-1* et qui présentent un phénotype masculin, mais avec hypospadias et hypogénitalisme, associé à des anomalies cutanées palmo-plantaires et dentaires (Micali et al., 2005).

Une des grandes différences entre la détermination ovarienne et celle du testicule réside donc dans la stabilisation de la β -caténine dans le cytoplasme des cellules qui vont ensuite se différencier soit en cellules de la granulosa soit en cellules de Sertoli à tel point que, chez la souris, l'expression d'une forme stable de la β -caténine dans une gonade XY suffit à orienter son développement vers la formation d'un ovaire (Maatouk et al., 2008). Ainsi, déstabilisation et stabilisation de la β -caténine sont la résultante de l'antagonisme entre le système SRY/SOX9/FGF9 et le système RSPO1/WNT4, le premier prenant le pas chez le mâle du fait, entre autres, de son expression plus précoce.

b) *FOXL2* : un gène de déterminisme ovarien mais aussi de maintenance ovarienne

La deuxième voie connue d'activation du développement ovarien est celle impliquant la protéine *FOXL2* (*Forkhead-box L2*). Dans l'espèce humaine, des mutations hétérozygotes du gène *FOXL2*, localisé en 3q23, ont été reconnues comme responsable du syndrome BPES (Blepharophimosis, Ptosis, Epicanthus inversus Syndrome) associant, dans le type I, des anomalies des paupières et une insuffisance ovarienne prématurée. Ce syndrome est proche de l'anomalie PIS (*Polled/Intersex Syndrome*) chez la chèvre où les individus hétérozygotes pour des mutations de *FOXL2* présentent une absence de cornes dans les deux sexes alors que les individus homozygotes, mais seulement ceux qui sont XX, montrent une réversion sexuelle dans le sens femelle-mâle avec, au niveau de la gonade en formation, une surexpression de *SOX9*, la formation de cordons séminifères et une différenciation des cellules somatiques en cellules de Sertoli (Pailhoux et al., 2002). Au moins dans cette espèce, le gène *FOXL2* apparaît donc comme un déterminant majeur pour orienter le choix des cellules de support de la gonade primitive vers leur transformation en cellules de la granulosa avec, par la suite, l'initiation de la méiose caractéristique de l'ovaire en formation (Boulanger et al., 2014).

Chez les souris XX *Foxl2*^{-/-}, à la naissance, on n'observe pas de réversion sexuelle comme chez la chèvre. Malgré tout, l'examen histologique des ovaires à deux semaines de vie révèle que les follicules ne sont pas normaux et qu'ils subissent ensuite une vague d'apoptose massive. Ces données montrent que la protéine *FOXL2*, outre son rôle dans le déterminisme ovarien, possède une fonction indispensable au maintien de la structure normale de l'ovaire et ce tout au long de la vie : ainsi, en miroir de l'inactivation conditionnelle du gène *Dmrt1* dans le testicule adulte, celle du gène *Foxl2* dans l'ovaire de souris adulte aboutit à la dé-répression immédiate du gène *Sox9* et à la modification des cellules de la granulosa et de la thèque qui acquièrent des caractéristiques de cellules de Sertoli et de Leydig respectivement (Huang et al., 2017; Matson et al., 2011; Uhlenhaut et al., 2009).

C. Facteurs génétiques impliqués dans la différenciation sexuelle

Depuis les travaux d'Alfred Jost, on sait que la différenciation des organes génitaux est sous le double contrôle hormonal des androgènes pour ce qui concerne le développement du tractus génital mâle et la masculinisation des organes génitaux externes et de l'AMH pour ce qui est de la régression du canal de Müller (Jost, 1991). Dès lors, toute anomalie dans la synthèse des androgènes ou dans leur réceptivité est susceptible d'altérer la masculinisation normale d'un fœtus XY et d'aboutir à une situation de DSD allant du simple défaut de virilisation à la réversion sexuelle complète. La caractéristique commune de ces dernières sera la disparition des structures Müllériennes, grâce à une sécrétion d'AMH conservée, avec un phénotype externe féminin mais un vagin borgne dont le développement sera limité à la prolifération tissulaire de la paroi postérieure du sinus uro-génital dont il est issu. A l'inverse, un défaut dans la synthèse d'AMH ou dans sa réceptivité se caractérisera par la persistance des structures Müllériennes chez un individu XY.

1. Synthèse des hormones stéroïdes et DSD (Tableau 3)

La forme de DSD la plus fréquente due à un défaut dans la biosynthèse des hormones stéroïdes est représentée sans conteste par les déficits en gluco/minéralo-corticoïdes par mutation d'un gène codant pour une enzyme, le plus souvent la 21-hydroxylase, impliquée dans leur métabolisme. Il s'ensuit une hyperstimulation de la surrénale (hyperplasie congénitale des surrénales) et de la seule voie disponible, celle de la synthèse des androgènes surrénaliens, entraînant la virilisation d'un fœtus XX associée ou non à un syndrome de perte d'eau et de sel en période néonatale.

Les défauts dans la synthèse des androgènes aboutissent quant à eux à des DSD XY à la naissance et à une insuffisance gonadique ultérieure. Selon le niveau du déficit enzymatique dans la chaîne de synthèse à partir du cholestérol, ils peuvent être associés à une insuffisance surrénalienne. Il en est ainsi des déficits en protéine StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*), en protéine P450_{scc} (*P450 Side Chain Cleavage*, gène *CYP11A1*) ou en enzyme 3βHSD II (3-béta HydroxyStéroïde Déshydrogénase II, gène *HSD3B2*). D'autres déficits enzymatiques ne sont que rarement associés à une insuffisance surrénalienne comme les déficits en protéine P450_{c17} (gène

CYP17A1) ou en P450 oxydoréductase (gène *POR*) alors que les derniers n'entraînent que des DSD XY comme les déficits en cytochrome b5 (gène *CYB5A*) ou en 17 β HSD3 (17-béta HydroxyStéroïde Déshydrogénase III, gène *HSD17B3*) (Auchus and Miller, 2012). Enfin, des mutations peuvent toucher le récepteur commun à la LH et à l'hCG (LHCGR) et entraîner un défaut de virilisation complet chez les sujets affectés (Mendonca et al., 2010).

La masculinisation des organes génitaux n'est pas sous la dépendance directe de la testostérone mais de son métabolite, la dihydrotestostérone (DHT), dont l'action va entraîner la fusion des bourrelets labio-scrotaux et la croissance du bourgeon génital en pénis. La DHT est produite de façon paracrine au niveau de la peau des organes génitaux par une enzyme, la 5-alpha réductase 2 codée par le gène *SRD5A2*. Des mutations homozygotes de ce gène, souvent décrites chez des individus consanguins, sont responsables de DSD XY avec un phénotype allant d'une simple hypovirilisation avec micropénis et hypospadias à un aspect féminin quasi-normal avec éventuellement une clitoridomégalie (Costa et al., 2012). Les variations phénotypiques sont à mettre au compte de la sévérité du déficit enzymatique mais aussi à celui de l'existence d'une deuxième voie de biosynthèse des androgènes, dite voie alternative (*backdoor pathway*), qui aboutit également à la production de DHT (Auchus and Miller, 2012).

Lorsque le diagnostic de déficit en 5-alpha réductase 2 n'est pas fait en période néonatale, il peut être porté à la puberté devant la virilisation (voix, pilosité, croissance pénienne, masses musculaires) d'un enfant élevé en fille en raison de l'activité d'une seconde enzyme, la 5-alpha réductase 1, qui est exprimée dans la peau à partir de cet âge (Costa et al., 2012).

Gènes impliqués dans la synthèse des hormones stéroïdiennes			
Gène	Locus chromosomique	Mode de transmission	Phénotype DSD et associé
<i>AKR1C</i>	10p15	AR (multigénique)	Cryptorchidie, hypovirilisation, réversion sexuelle
<i>CYB5A</i>	18q22.3	AR	OGE ambigu (méthémoglobinémie)
<i>CYP11A1</i>	15q24.1	AR	XY : OGE ambigu à féminins XX : virilisation des OGE (insuffisance surrénalienne, syndrome de perte d'eau et de sels)
<i>CYP17A1</i>	10q24.32	AR	XY : OGE ambigu à féminins, tractus génital hypoplasique, cryptorchidie
<i>CYP21A1</i>	6p21.33	AR	XX : virilisation des OGE (insuffisance surrénalienne)
<i>HSD3B2</i>	1p12	AR	XY : hypovirilisation (possible syndrome de perte d'eau et de sels)
<i>HSD17B3</i>	9q22.32	AR	XY : OGE ambigu à féminins, cryptorchidie
<i>POR</i>	7q11.23	AR	XY : hypovirilisation XX : virilisation des OGE
<i>SRD5A2</i>	2p23.1	AR	XY : OGE ambigu, micropénis
<i>STAR</i>	8p11.23	AR	XY : OGE féminins, tractus génital hypoplasique, cryptorchidie (insuffisance surrénalienne, syndrome de perte d'eau et de sels)

Tableau 3. Tableau récapitulatif des gènes impliqués dans la synthèse des hormones stéroïdiennes (Baetens et al., 2019)

DG : dysgénésie gonadique ; OGE : organes génitaux externes ; DI : déficience intellectuelle ; AR : autosomique récessif ; AD : autosomique dominant ; XL : lié à l'X ; YL : lié à l'Y.

2. Anomalies de la réceptivité : insensibilité complète ou partielle aux androgènes

Comme toutes les hormones stéroïdes, les androgènes franchissent librement la membrane plasmique des cellules cibles pour se fixer sur leur récepteur (AR : *Androgen Receptor*) ce qui a pour effet de provoquer sa dimérisation et sa translocation dans le noyau où il va agir comme un facteur de transcription sur un certain nombre de gènes possédant, dans leur partie régulatrice, une séquence consensus de réponse aux androgènes ARE (*Androgen Responsive Element*). Le gène *AR* est situé sur le bras long du chromosome X ce qui fait que les mutations l'affectant seront transmises sur le mode récessif lié à l'X, c'est-à-dire touchant des individus XY à partir de femmes XX conductrices. Ce dernier point est important car il sous-entend qu'il puisse exister des familles entières dans lesquelles une mutation pourra ségréger et que toute découverte d'une mutation du gène *AR* dans une famille implique une enquête familiale approfondie à la recherche de ces femmes conductrices.

a) Gène du Récepteur aux Androgènes (AR)

Le gène *AR* codant pour le récepteur aux androgènes (920 acides aminés), situé en position Xq12 et composé de huit exons, par son effet virilisant sur les tissus cibles, est un gène pouvant être impliqué dans des défauts de virilisation, comme l'atteste déjà l'étude d'Aschim et al. (Figure 7) (Aschim et al., 2004a).

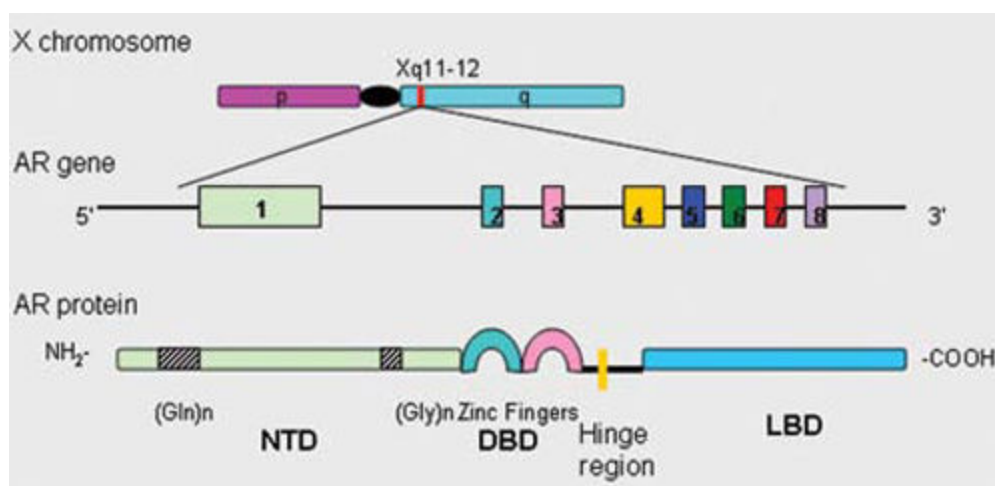


Figure 7. Structure du gène et de la protéine du récepteur aux androgènes (AR).

En reprenant l'hypothèse initiale selon laquelle l'hypospadias est une anomalie androgéno-dépendante, le gène *AR* est essentiel dans le développement de la masculinisation. Dans les cas d'insensibilité aux androgènes, il existe un défaut de différenciation du sexe masculin avec phénotype totalement féminin dans les formes d'insensibilité complète et un hypospadias sévère dans les formes partielles (Figure 8).

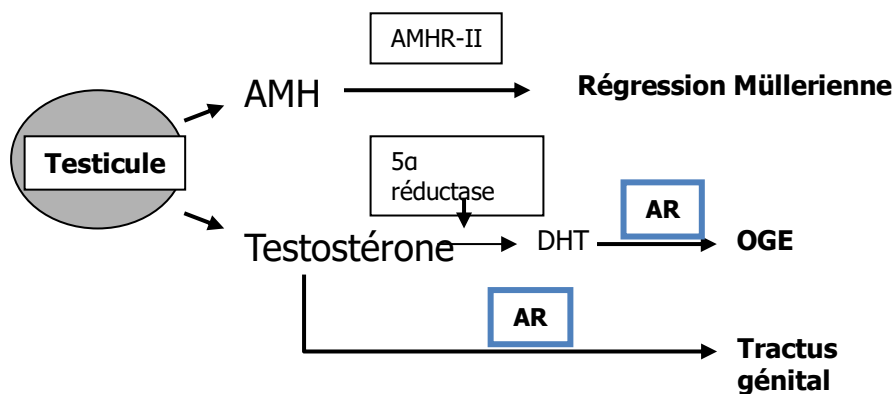


Figure 8. Sites d'action du gène *AR* dans la différenciation sexuelle.

AMH, Anti Mullerian Hormone ; AMHR, Anti Mullerian Hormone Receptor; AR, Androgen Receptor.

La protéine codée comporte une organisation fonctionnelle principale en trois domaines (Figure 7) :

- le *domaine d'activation de la transcription* (TAD), codé par l'exon 1, représente 50% de la protéine. Il contient deux régions de polymorphismes : une répétition de glutamines codée par une suite de triplets CAG (La Spada et al., 1991) dont le nombre moyen est de 21+/-2 et une répétition de glycines codée par une suite de triplets GGn (Lumbroso et al., 1997) dont le nombre est compris entre 10 et 31. Ce domaine est essentiel à l'activité de transcription du récepteur aux androgènes au niveau des gènes cibles ;
- le *domaine de liaison à l'ADN* (DBD), codé par les exons 2 et 3, est un domaine très conservé. Il code respectivement pour une structure en doigt de zinc responsable d'une interaction entre le récepteur et l'ADN du gène cible androgénosensible et une autre structure en doigt de Zinc ayant un rôle stabilisateur de cette interaction ;
- le *domaine de fixation du ligand* (LBD), est codé par les exons 4 à 8. Il a pour fonction de fixer les ligands comme la testostérone ou dihydrotestostérone ainsi que les protéines inhibitrices comme les protéines de choc thermique.

Par son effet virilisant sur les tissus cibles, le gène *AR* est susceptible d'être impliqué dans la survenue de l'hypospadias, comme le suggère déjà les études d'Aschim et al. (Aschim et al., 2004a) et Lim et al. (Lim et al., 2000).

b) Dysfonctionnements du gène *AR*

La perte de fonction du récepteur *AR* entraîne un défaut de masculinisation d'un fœtus XY, défaut qui peut aboutir à une insensibilité complète aux androgènes (*CAIS : Complete Androgen Insensitivity Syndrome*) ou seulement partielle (*Partial AIS*) voire à une forme mineure (*Mild AIS*) (Hughes et al., 2012a). Paradoxalement, l'insensibilité complète n'est pas la forme clinique la plus sévère puisqu'elle s'accompagne d'un phénotype féminin normal et qu'elle n'est souvent diagnostiquée qu'à la puberté devant la survenue d'une aménorrhée primaire en raison de l'absence de toutes les structures Müllériennes. Un diagnostic néonatal est cependant possible par la constatation d'une hernie inguinale bilatérale ou de la tuméfaction d'une grande lèvre, les deux étant liés à la présence de testicules d'aspect histologique normal

et qui auraient dû normalement se placer en position intrascrotale. Un diagnostic prénatal est même assez courant lorsque le caryotype fœtal a été réalisé et qu'il existe une discordance entre la formule chromosomique XY et le sexe échographique. Le risque est que cette présentation clinique ne soit pas liée à un CAIS mais à un déficit sévère en 5-alpha-réductase 2, qui est le diagnostic différentiel, et que les mesures pour prévenir la masculinisation pubertaire ne soient pas prises.

L'insensibilité partielle aux androgènes pose des problèmes de prise en charge et de déclaration de sexe beaucoup plus sérieux puisque la présentation clinique la plus fréquente est celle d'un enfant *a priori* de sexe masculin mais hypovirilisé avec un micropénis, un hypospadias postérieur pénoscrotal et un scrotum bifide pouvant contenir une gonade. Parfois, le caractère partiel de l'insensibilité ne se manifeste que par une clitoridomégalie chez une petite fille dont les examens montreront qu'elle a un caryotype XY et une absence d'utérus à l'échographie. Quant à la forme mineure de l'insensibilité aux androgènes, c'est un diagnostic chez l'adulte devant la constatation d'une oligozoospermie chez un homme cliniquement sans particularité (Hughes et al., 2012a).

c) Pathologies associées

Le gène *AR* est connu comme étant potentiellement polymorphe et pouvant être associé à diverses pathologies. Une base de données spécifique lui est consacrée et répertorie toutes les variations décrites sur ce gène qu'il s'agisse de mutations ou de polymorphismes connus (Gottlieb et al., 2012).

Des polymorphismes sur la zone de répétition CAG (polyglutamine) sont décrits dans plusieurs pathologies constitutionnelles ou acquises (Figure 9).

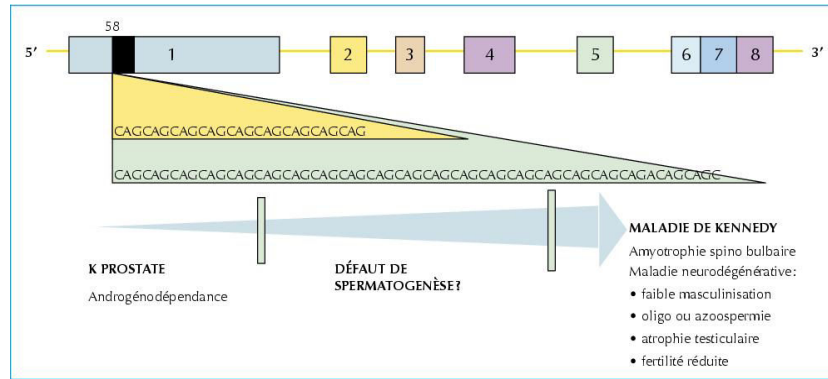


Figure 9. Représentation schématique de la variation des triplets CAG selon la pathologie.

La maladie de Kennedy est une neuropathie dégénérative fatale qui est associée à une répétition du triplet de plus de 40 exemplaires (Kumar et al., 2011). A l'inverse, en cas de cancer de la prostate, il est décrit, au sein des cellules adénocarcinomeuses, une diminution du nombre de ces triplets associé à une augmentation de l'activité du récepteur (Hardy et al., 1996).

Des études *in vivo* et *in vitro* montrent une relation inverse entre le nombre de triplets CAG de l'exon 1 et l'activité transcriptionnelle du gène *AR*, suggérant un rôle régulateur de l'activité de transcription (Kazemi-Esfarjani et al., 1995).

Dans les cas d'hypospadias isolé sans ADS vraie, c'est-à-dire en dehors du syndrome d'insensibilité partielle aux androgènes, une association a été mise en évidence entre des polymorphismes touchant cette zone de répétition dans le gène *AR* et l'hypospadias (Parada-Bustamante et al., 2012). Dans cette même étude, il n'est pas montré de différence significative sur la deuxième zone de répétition de GGn (polyglycine) comme le suggérait d'autres études (Aschim et al., 2004a). Les données de la littérature sont donc contradictoires concernant l'action du gène *AR* dans la formation de l'hypospadias.

3. Cryptorchidie bilatérale et anorchidie

La migration des testicules dans le scrotum est un processus comportant deux phases, l'une précoce dite trans-abdominale (premier trimestre de grossesse), l'autre inguino-scrotale qui a lieu en fin de grossesse. Le non-achèvement de ce

processus à la naissance, ou cryptorchidie, est banal et n'appelle en général que des mesures de surveillance surtout si l'anomalie est unilatérale. En cas de cryptorchidie bilatérale, la question se pose de savoir si un facteur génétique n'est pas en jeu : ainsi, malgré l'implication certaine de facteurs environnementaux dans cette pathologie, les perturbateurs endocriniens notamment, la constatation d'une héritabilité forte, *i.e.* un risque plus élevé chez les enfants dont le père a également présenté une cryptorchidie, suggère l'existence de gènes causaux ou au moins de gènes de prédisposition. Sur la base de modèles murins, des mutations dans le gène *INSL3* (*Insulin Like 3*) et dans celui de son récepteur *LGRF8* ou *RXFP2* (*Relaxin/Insulin-like Family Peptide receptor 2*) ont été décrites chez l'homme (Hughes and Acerini, 2008). Néanmoins, aucune étude d'association (GWAS : *Genome Wide Association Study*) n'a pu mettre en évidence de locus génétique spécifiquement lié à la cryptorchidie ce qui traduit l'extrême hétérogénéité génétique de cette malformation, comme l'atteste son existence dans de très nombreux syndromes chromosomiques ou géniques.

Une autre cause possible de cryptorchidie bilatérale est l'existence d'un obstacle mécanique à la descente testiculaire. Ainsi, la persistance de dérivés Müllériens sur le trajet des testicules par mutation soit du gène de l'AMH soit de son récepteur (AMHR-II) est également une cause de cryptorchidie bilatérale chez des garçons normalement virilisés par ailleurs (Josso et al., 2005).

L'absence de testicule en position intrascrotale n'est pas forcément synonyme de cryptorchidie mais peut révéler une anorchidie surtout s'il existe un DSD associé. En réalité, l'absence totale de formation des testicules devrait s'accompagner d'un phénotype féminin comme dans les dysgénésies gonadiques pures. La constatation de cette malformation chez un garçon totalement ou partiellement virilisé signifie qu'un testicule a été actif pendant la vie fœtale et qu'il a disparu secondairement : on parle alors de syndrome de régression testiculaire (TRS : *Testicular Regression Syndrome*) qui, lorsqu'il est unilatéral, est le plus souvent rattaché à un accident vasculaire comme la torsion d'un testicule mais qui pose la question d'une éventuelle origine génétique quand il est bilatéral. Le gène *NR5A1* (SF1) a été incriminé mais sans que son implication ait pu être confirmée et récemment des mutations dans le gène *DHX37*, codant pour une ARN-hélicase nécessaire à la fabrication des ribosomes, ont été retrouvées chez 9/81 (11%) cas de dysgénésies gonadiques mais aussi chez 4/16 (25%) garçons présentant un TRS (McElreavey et al., 2019).

D. Facteurs non génétiques impliqués dans le déterminisme testiculaire et la différenciation sexuelle

L'étiologie des anomalies du développement sexuel est probablement multifactorielle : génétique et environnementale (van der Zanden et al., 2012). Dans 30% des cas d'hypospadias postérieurs, une cause peut être identifiée comme une insensibilité partielle aux androgènes mais les formes isolées, qui sont les plus fréquentes, restent donc le plus souvent inexplicables. Devant l'augmentation récente de l'incidence, les principaux facteurs de risque retrouvés de façon significative dans les différentes études sont (Morera et al., 2006) :

- *endocriniens*, en particulier par les traitements médicamenteux pris avant (fécondation *in vitro*) et pendant la grossesse comme la progestérone, la F.S.H., les anti-androgènes, le diethylstilbestrol (D.E.S.) et les A.I.N.S. (Sultan et al., 2001) ;
- *environnementaux* (pesticides doublant le risque, tabagisme) ;
- *vasculaires* probablement d'origine placentaire (poids de naissance < 2500 g, prématurité, prééclampsie et insuffisance placentaire, gémellité, âge maternel < 20 ou > 35 ans).

Une liste quasi complète a été décrite par Yang et al. en 2013 incluant 318 études (Yang et al., 2014).

1. Perturbateurs endocriniens

On peut citer par exemple l'étude de Govers et al. qui ont montré l'effet de l'atrazine, un pesticide interdit par l'Union Européenne mais encore largement utilisé aux États-Unis et en Australie, sur les anomalies de la verge (Govers et al., 2019a). L'atrazine est connue pour altérer la production de testostérone et d'œstrogènes. Chez un modèle murin exposé à ce pesticide *in utero*, cela conduisait à une verge de plus petite taille et à la formation significativement plus élevée d'hypospadias. De même, des études portant sur l'exposition des fœtus et des embryons à des polluants organiques (PFAA, produits chlorés ou bromés) en Scandinavie a montré 1) la présence de polluants dans le sang des nouveau-nés 2) une diminution de l'activité du gène *AR* et 3) l'inhibition de la translocation de la protéine *AR* conduisant ainsi à une hypovirilisation (McComb et al., 2019). Une étude épidémiologique française a inclus 9281 garçons donc

53 étaient nés avec un hypospadias et 137 avec une cryptorchidie : l'utilisation de pesticides d'usage domestique (contre les puces et les tiques) était significativement associée au risque d'hypospadias (OR = 2,28 ; 95% IC (1,09 - 4,75)) (Cognez et al., 2019). De façon surprenante, l'analyse du méconium à la naissance (alors qu'il est théoriquement stérile et libre de tout « polluant ») chez les enfants porteurs d'un hypospadias a montré une concentration 5 à 6 fois plus élevée de pesticides (Haraux et al., 2018). Les pesticides utilisés en agriculture non biologique ont été étudiés sur une cohorte de 304 906 enfants en Caroline du Nord : en plus d'être associés à la survenue d'un hypospadias, cette cohorte illustre le rôle des pesticides sur la survenue de malformations congénitales cardiaques (Rappazzo et al., 2019). De même, Carmichael et al. ont recherché sur 690 cas d'hypospadias l'exposition proche aux pesticides (< 500 m) : des herbicides, des fongicides et des insecticides ont été alors incriminés avec des odds ratio entre 1,9 et 2,9 (Carmichael et al., 2013a).

L'exposition des futurs parents à des perturbateurs endocriniens et au tabagisme est un facteur de risque indéniable dans la survenue d'un hypospadias (OR = 4,08, 95% IC (2,03 – 8,96)) (Estors Sastre et al., 2019). Par exemple, les polybromodiphényléthers, qui sont largement présents dans notre quotidien puisqu'ils sont utilisés dans tous les produits plastiques pour réduire le risque inflammable, sont présents de façon significativement plus élevée dans les cheveux des mères d'enfants porteurs d'un hypospadias (Koren et al., 2019). Les phtalates, présents en grande quantité dans les matériaux en plastique, conduisent à la survenue d'hypospadias en dérégulant l'autophagie des cellules urothéliales et en empêchant une bonne transition entre les cellules mésenchymateuses et les cellules urothéliales, le tout dans un environnement hypovirilisé avec des taux de concentration de testostérone et des taux d'expression d'AR diminués (Zhao et al., 2018). Sathyanarayana et al. expliquent cela par l'effet *estrogen-like* des phtalates avec des concentrations d'estrone et d'estradiol 15 à 30% plus élevés (Sathyanarayana et al., 2017).

L'étude française par Haraux et al. a étudié l'exposition aux cosmétiques capillaires. Le résultat est sans appel : en analyse multivariée, l'association est très élevée (OR = 9.6 ; 95% IC (1,4 – 66,1)) (Haraux et al., 2016). En outre, une autre étude française a montré l'association entre perturbateurs endocriniens et hypospadias avec un facteur 3. Les substances les plus fréquemment retrouvées étaient les solvants de peintures, les pesticides et les cosmétiques, d'où une survenue d'hypospadias plus

fréquente chez les mères étant personnel d'entretien, coiffeuse ou esthéticienne (Kalfa et al., 2015).

L'exposition aux métaux lourds a été étudiée au Texas par White et al. sur près de 9000 enfants porteurs d'un hypospadias. La présence de manganèse, de cadmium, de mercure et de nickel était significativement associée au risque d'hypospadias (White et al., 2019). Les polluants aériens sont également maintenant connus comme des facteurs de risques d'hypospadias : les particules fines (PM 2,5), entre autres, interviendraient négativement sur le bon développement gonadique en période périconceptionnelle (Ren et al., 2018; Sheth et al., 2019).

La liste la plus complète des perturbateurs endocriniens est disponible dans les revues de littérature, en particulier celle de Raghavan et al., Botta et al. et Kalfa et al. (Kalfa et al., 2009a, 2015; Gaspari et al., 2011; Botta et al., 2014; Raghavan et al., 2018).

2. Facteurs associés à la grossesse

Les facteurs maternels impliqués dans l'étiologie de l'hypospadias sont nombreux : la primiparité, un âge maternel ≥ 35 ans, le surpoids et qui plus est l'obésité, l'endométriose, la consommation de pilules contraceptives en début de grossesse, la consommation de tabac et d'autres substances addictives (alcool, cannabis et même café) sont listés comme de potentiels facteurs de risque (Carmichael et al., 2007, 2017; Arendt et al., 2017a; Estors Sastre et al., 2019). Une liste exhaustive est présente dans la revue de la littérature de Georges et al. en 2015 (Tableau 4) (George et al., 2015).

Factors frequently investigated	
Factors consistently associated with hypospadias	Factors consistently not associated with hypospadias
LBW/SGA	Gestational diabetes
Placental insufficiency	Maternal alcohol consumption
Maternal Hypertension	
Pre-eclampsia	
Maternal intrauterine DES exposure	
Factors associated with hypospadias in most studies	Factors not associated with hypospadias in most studies
ICS	OCPs during pregnancy
Prolonged TTP	IVF
High maternal BMI	Hormonal stimulation for pregnancy induction
Primiparity	Loratadine
Multiple pregnancy	Folic acid
Pre-existing maternal diabetes	Paternal age
Maternal use of antiepileptics	Maternal smoking
	Maternal exposure to water disinfection products
Factors showing inconsistent results	
Preterm	
Iron supplementation	
Maternal age	
Maternal vegetarian diet	
Maternal fish consumption	
Maternal and paternal exposure to pesticides	
Maternal occupational exposure to endocrine disruptors, heavy metals, phthalates	
Maternal serum levels of PCB's	
Seasonal trend	
Factors not frequently investigated	
Factors that seem to be associated with hypospadias	Factors that do not seem to be associated with hypospadias
Paternal subfertility	Weight gain during pregnancy
Absence of nausea and vomiting in early pregnancy	Maternal corticosteroids and antibiotics
Bleeding during pregnancy	Most paternal and maternal occupational exposures
Complications during labour	
Maternal use of antihypertensive	
Factors showing inconsistent results	
Early age at menarche	
Maternal thyroid disease	
Fever in first trimester	
Progestin/progestogens for threatened abortion	
Paternal heavy metal exposure	
Living in rural or urban areas	

Tableau 4. Facteurs cliniques, comportementaux, professionnels et environnementaux ayant été analysé comme potentiel facteur de risque de survenue d'un hypospadias (George et al., 2015).

Le diabète gestationnel est également associé à un risque plus élevé de malformations congénitales en général. Les études épidémiologiques danoises et suédoises ont inclus 2 416 248 nouveau-nés dont 12 849 étaient nés avec un hypospadias. Le diabète gestationnel, en particulier s'il était mal équilibré, multipliait par 2 le risque de survenue d'un hypospadias (HR = 2,33, 95% IC (1,48 – 3,66)) et de cryptorchidie (HR = 1,92, 95% IC (1,39 – 2,65)) (Arendt et al., 2018a). Des études américaines ont également montré en 2007 puis en 2013 le lien entre obésité maternelle et risque d'hypospadias (OR = 1,78, 95% IC (1,13 – 2,78)) (Carmichael et al., 2007; Marengo et al., 2013). Cela a été confirmé par une cohorte suédoise, en particulier pour des IMC > 40 kg/m² (HR = 1,35) (Arendt et al., 2017b).

L'hypertension maternelle, la prééclampsie, et, dans une moindre mesure, l'hypertension gravidique sont également connues comme des facteurs de risque d'hypospadias, suggérant que la dysfonction placentaire joue un rôle dans le déficit androgénique en début de grossesse (Van Zutphen et al., 2014; Greenhill, 2014; Sheriff et al., 2019; Arendt et al., 2018b). Les bêtabloquants non sélectifs seraient les molécules les plus délétères également (Van Zutphen et al., 2014).

Buur et al. ont récemment prouvé l'effet sur le développement des OGE masculins des contraceptifs oraux : cette étude épidémiologique danoise sur 44 408 nouveau-nés masculins a montré que l'exposition post-conceptionnelle à de la contraception orale augmentait sensiblement le risque d'hypospadias (Buur et al., 2019). De même, les techniques de PMA donnent de façon générale naissance à des enfants avec plus de malformations congénitales, en particulier au niveau du cœur, du massif facial, de la moelle épinière, de l'œsophage et du complexe sphinctérien anorectal. En 2017, Liberman et al. ont analysé 17 829 grossesses induites par PMA : la survenue d'un hypospadias était l'anomalie la plus fréquente avec un OR à 1.8 (Liberman et al., 2017). En particulier, l'indication pour endométriose et la technique de l'ICSI seraient associées à un risque plus élevé de malformations urogénitales (hypospadias et cryptorchidie) (Arendt et al., 2017a; Massaro et al., 2015).

Les autres médicaments connus sont les antiépileptiques. Alors que l'acide valproïque est déjà listé comme facteur de risque de survenue d'un hypospadias (Mavrogenis et al., 2014; Veiby et al., 2014), une cohorte française a montré la dangerosité d'autres antiépileptiques (OR = 1,6 – 14,2) : carbamazépine, gabapentine,

lamotrigine, topiramate (Blotière et al., 2019). Par ailleurs, l'épisode du traitement par diéthylstilbestrol (DES, Distilbène[®]), un œstrogène de synthèse, fait partie de ces épisodes dramatiques de l'histoire de la médecine (Kalfa et al., 2011a; Fénelichel et al., 2015; Mahawong et al., 2014; Mavrogenis et al., 2014; Tournaire et al., 2018). Elle est à la base des hypothèses concernant le rôle de l'exposition fœtale aux perturbateurs endocriniens estrogéno-mimétiques sur la programmation à distance de pathologies chroniques adultes et sur leur éventuelle transmission transgénérationnelle via des mécanismes épigénétiques (Fénelichel et al., 2015; Skinner, 2016). Enfin, contrairement à l'utilisation pendant la grossesse de paracétamol ou de morphine, les mères ayant déclaré avoir pris des A.I.N.S. avaient un risque significativement plus élevé d'avoir un enfant porteur d'un hypospadias (OR = 1,5) (Interrante et al., 2017).

Par ailleurs, l'isoflavone contenu dans le soja serait également un facteur de risque par son caractère estrogéno-mimétique. Sur 41 578 grossesses au Japon, Michikawa et al. ont montré un risque plus élevé d'un facteur 3 en cas de surconsommation en soja (Michikawa et al., 2019). De plus les régimes véganes, végétariens ou végétaliens, pendant la grossesse seraient associés à un plus grand risque d'hypospadias dont l'étiopathogénie est encore mal expliquée (Carmichael et al., 2013b; Piccoli et al., 2015). Cela a été vérifié par une méta-analyse incluant huit études et 3111 enfants nés avec un hypospadias (OR = 1,39) (Tan et al., 2019).

3. Facteurs vasculaires

Le R.C.I.U. et les petits poids de naissances sont connus comme étant des facteurs de risque de survenue d'un hypospadias. Le dysfonctionnement placentaire d'origine vasculaire en est l'explication la plus logique. Mais, de façon surprenante, la prématurité n'est pas un facteur de risque en tant que tel (Hashimoto et al., 2016).

La prééclampsie, reflet d'un mauvais fonctionnement placentaire, a été bien étudié et est liée à la survenue d'un hypospadias ($p < 0,05$), surtout si elle est associée à un R.C.I.U. ($p < 0,001$) (Nelson et al., 2015).

Ce que l'on peut retenir en conclusion de ce chapitre est que l'hypospadias est une malformation dont les étiologies sont multiples et qu'il existe vraisemblablement un ensemble de phénomènes causaux associant environnement, perturbateurs endocriniens et modifications du génome par simple polymorphisme, réelle mutation ou mécanisme épigénétique (Bouty et al., 2015; Marrocco et al., 2015; Skinner, 2016). On peut donc parler ainsi du *Testicular Dysgenesis Syndrome* qui réunit toute anomalie des testicules et des OGE (Figure 10).

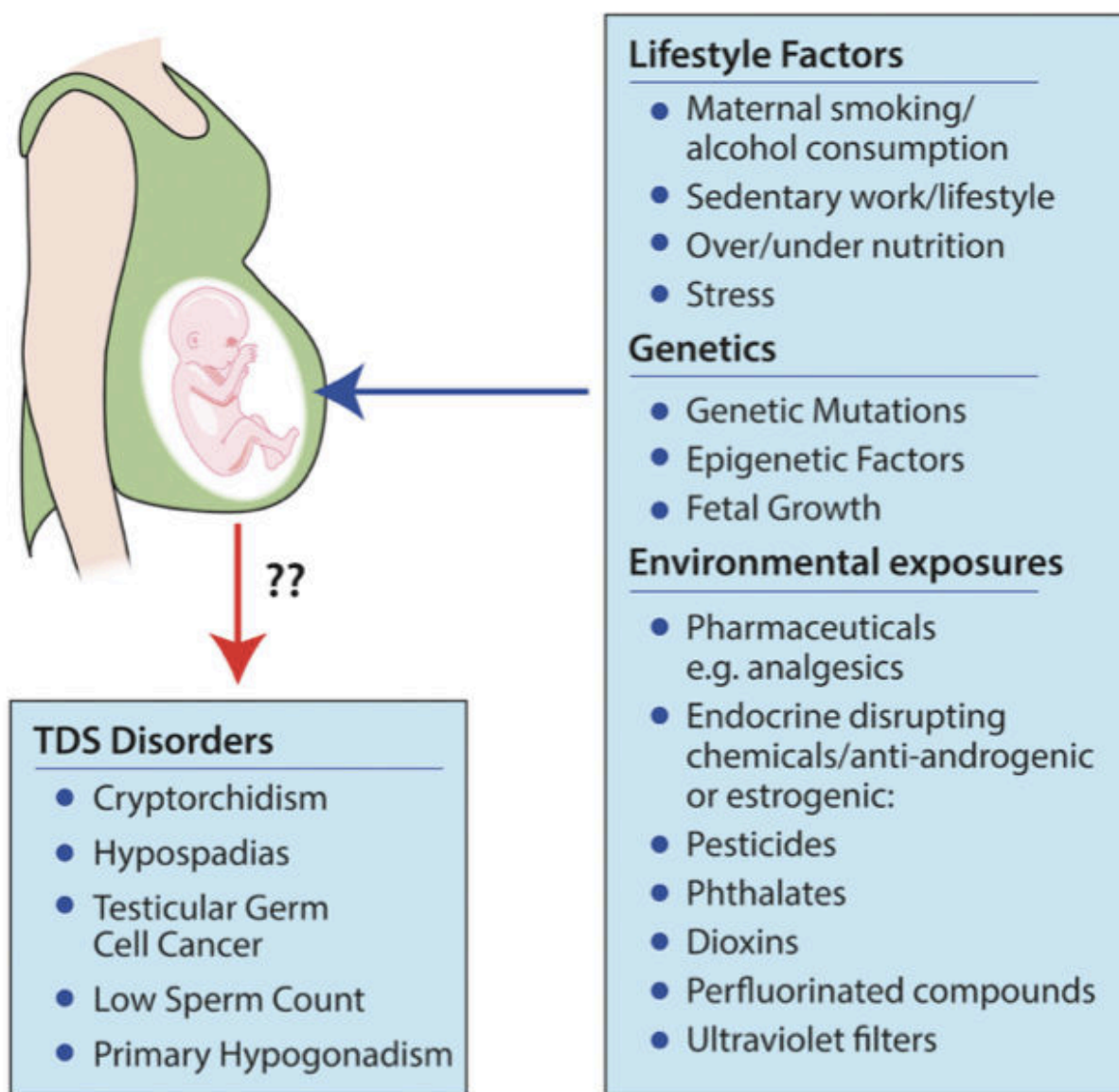


Figure 10. Facteurs *in utero* prédisposants au *testicular dysgenesis syndrome* (Kilcoyne and Mitchell, 2017)

E. Hypospadias

Un chapitre à part entière est consacré à cette malformation génitale du fait de sa fréquence et de l'importance qu'elle revêt dans ce travail de thèse.

L'hypospadias est une malformation de l'urètre masculin caractérisée par une position ectopique du méat urétral venant s'aboucher sur la face ventrale du pénis.

1. Epidémiologie

L'incidence de cette pathologie, qui a doublé depuis dix ans, est de 0,4 à 8,2 pour 1000 garçons vivants, soit un cas pour 125 à 300 naissances (Lund et al., 2009; Yu et al., 2019). C'est l'anomalie uro-génitale la plus fréquente chez le garçon. Elle entre dans la classification des DSD de type 46,XY. Cette fréquence est en augmentation depuis deux décennies et variable selon les pays et la qualité des études épidémiologiques, entre 1 cas sur 200 à 1 cas sur 2000 naissances vivantes (Springer et al., 2016; Yu et al., 2019; Spinoit, 2019). Ces anomalies échappent dans la grande majorité des cas à l'échographie anténatale. Ceci évite une enquête anténatale, qui serait, dans l'immense majorité des cas, inutile sur le plan médical, mais toujours oppressante pour les parents.

2. Anatomie et classification

Plus complexe que la simple ectopie du méat urétral, l'hypospadias peut être défini comme l'association de plusieurs anomalies (Figure 11) :

- *Une ouverture ectopique du méat urétral* sur la face ventrale de la verge pouvant se situer sur toutes les zones de la verge, de la base à l'apex ;
- *Le coude ventral de la verge* visible à l'état flaccide ou en érection qui peut être plus ou moins marquée, et ;
- *Une distribution anormale de la peau pénienne*, avec une hypoplasie ventrale et un excès de peau sur la face dorsale de la verge.

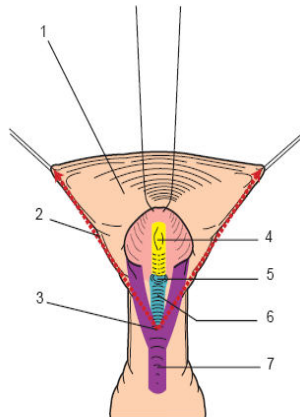


Figure 11. Anatomie chirurgicale de l'hypospadias (Mouriquand and Mure, 2004).

1 : prépuce en tablier de sapeur, 2 : jonction cutanéomuqueuse, 3 : division du corps spongieux, 4 : gouttière urétrale, 5 : abouchement ectopique du méat, 6 : urètre hypoplasique, 7 : urètre normal.

Les hypospadias associent une anomalie des trois constituants de la verge :

- L'urètre ;
- Les corps caverneux, et ;
- Le fourreau cutanéomuqueux.

La zone d'hypoplasie à la face ventrale de la verge constitue un triangle dont le sommet correspond à la division anormale des corps spongieux. La base de ce triangle est représentée par la face ventrale du prépuce qui est largement ouverte (Figure 12).

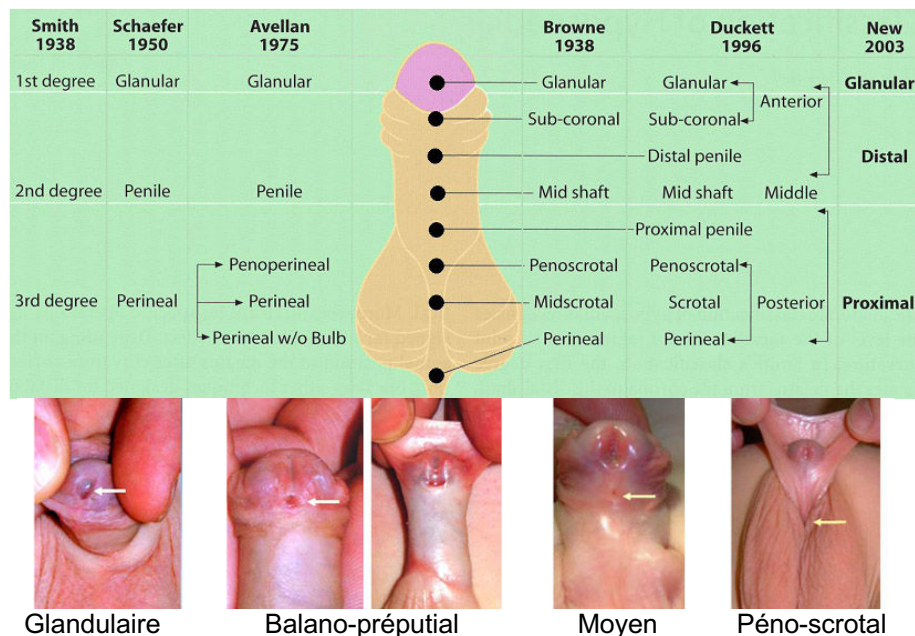


Figure 12. Évolution de la classification de l'hypospadias (Hadidi and Azmy, 2011).

La sévérité de l'atteinte est classiquement définie en fonction de la position du méat urétral sur la verge mais doit tenir compte de la division du corps spongieux, surtout pour la reconstruction chirurgicale.

On peut ainsi distinguer trois types d'hypospadias :

Les hypospadias antérieurs les plus fréquents (50% des cas), regroupant les formes glandulaires, balaniques ou rétro-balaniques. Ces formes sont associées fréquemment à une courbure de verge, mais qui reste minime (souvent limitée à une bascule antérieure du gland), et s'accompagnant de l'absence du prépuce sur la face antérieure de la verge. De plus, ces hypospadias sont dits isolés, car ils ne sont pas associés ni à un micropénis, ni à une hypoplasie des corps caverneux (éventuellement un peu courbés, mais avec un bon développement), ni à une anomalie de la migration testiculaire;

- *Les hypospadias moyens*, pour lesquels le méat est situé sur le corps du pénis, qui s'accompagnent régulièrement d'un coude plus marqué, et ;
- *Les hypospadias postérieurs* (20%), où la position du méat peut aller de la jonction pénéo-scrotale jusqu'au niveau du scrotum, voire au périnée. Ces formes sont associées à un scrotum bifide.

L'hypospadias peut donc être défini comme une hypoplasie des tissus formant la face ventrale de la verge au-delà de la division des corps spongieux (Salam, 2013).

3. Base génétique des hypospadias

Dans l'espèce humaine, une origine génétique de l'hypospadias a été attestée. Des études de ségrégation portant sur un grand nombre de familles ont montré une agrégation familiale dans 9 à 17% (de 4% à 25%) des cas (Fredell et al., 2002; Kalfa et al., 2011b; Schnack et al., 2008).

a) Régulation génétique du développement embryologique

Les étapes du développement de l'appareil génital subissent une régulation génétique et hormonale. La formation du tubercule génital implique plusieurs gènes (Klonisch et al., 2004). *Sonic Hedgehog (Shh)*, *Fibroblast growth factors (FGFs)*, *Bone morphogenic proteins (BMPs)*, *Homeobox (Hox)*, *Wnt/β catenin* ont été identifiés chez la souris (Kojima et al., 2010). Chez l'homme, les gènes *FGF8* (Liu et al., 2012) ou encore *FGFR2*, *BMP4*, *BMP7*, *HOXA4* et *HOXB6*, qui sont impliqués dans la formation du tubercule génital, comportent des polymorphismes (SNPs) ayant été associés à des cas d'hypospadias (Beleza-Meireles et al., 2007a; Chen et al., 2007).

b) Formes syndromiques

L'hypospadias peut être, dans certains cas, associé à des syndromes génétiques connus (Wang et al., 2004) et pour lequel le diagnostic est facilement établi.

Le syndrome de Denys-Drash associe une néphropathie glomérulaire, une ADS de caryotype 46,XY et une prédisposition au néphroblastome (tumeur de Wilms) (Mueller, 1994). Habituellement sporadique, il est dû à une mutation constitutionnelle des exons 8 et 9 du gène *WT1* situé sur le chromosome 11. Ce gène régule l'expression du gène *SRY*. Son expression est indispensable à la formation du système génito-urinaire pendant l'embryogénèse.

Le syndrome WAGR est caractérisé par l'association d'une tumeur de Wilms, d'une aniridie, d'une anomalie génito-urinaire, allant du véritable ADS à la cryptorchidie palpable, et d'un retard mental de sévérité variable. Il est la conséquence d'une microdéletion, le plus souvent *de novo*, sur la région 11p13 du chromosome 11. Cette délétion concerne les gènes contigus *WT1* et *PAX6*. Le gène *PAX6* est impliqué dans le développement oculaire, des organes sensoriels et des tissus neuronaux et épidermiques.

c) Formes monogéniques

Une hérédité multifactorielle est suspectée dans la majorité des cas alors que les formes monogéniques sont rares.

Certaines mutations sur les gènes *NR5A1* (Köhler et al., 2009) ou *Dax1* (Mohnach et al., 2016) intervenant dans le déterminisme testiculaire ont été décrites comme pouvant être associées à des formes sévères d'hypospadias (Wu et al., 2012). Le gène *MAMLD1*, codant pour une protéine co-activatrice de la voie de signalisation Notch est sous la dépendance du gène *NR5A1*. Il a été mis en cause dans trois cas d'hypospadias dans une cohorte de 166 patients (Fukami et al., 2006), ainsi que dans certaines formes d'hypospadias isolés de gravité variable (Kalfa et al., 2008). Il semble que les gènes *NR5A1* et *MAMLD1* soient donc impliqués dans la sécrétion de testostérone à un moment critique du développement génital (Ogata et al., 2009). D'autre part, le caractère androgéno-dépendant de la masculinisation des organes génitaux externes suppose que les gènes impliqués dans l'hypospadias soient directement ou indirectement liés à l'action des androgènes (Figure 13).

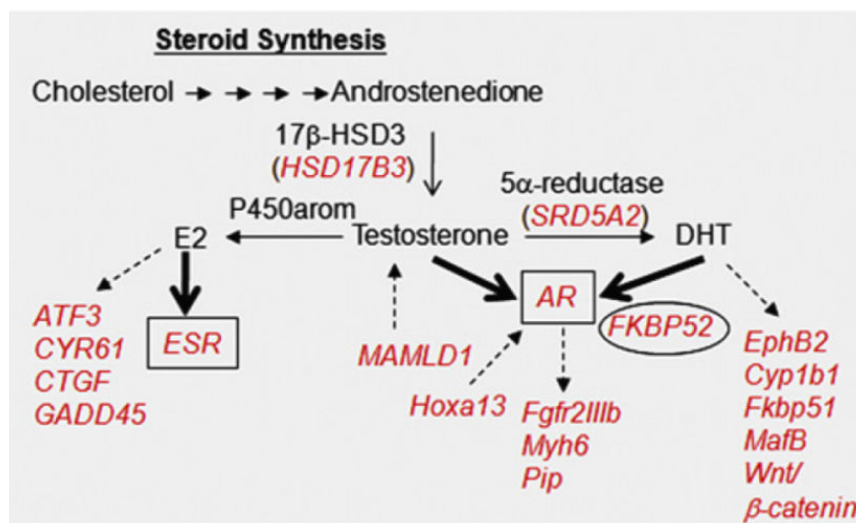


Figure 13. Rôle des gènes *AR* et *MAMLD1* dans la stéroïdogénèse (Kojima et al., 2010).

d) Gène *MAMLD1*

Possédant un site de liaison pour NR5A1/SF1, le gène *MAMLD1* (initialement *CXorf6*), situé en Xq28 et composé de six exons codant pour une protéine

de 774 résidus, permet d'augmenter la synthèse de testostérone. Il a été également impliqué dans l'hypospadias après la description de mutations non-sens chez 3/166 individus atteints (152 cas sporadiques et 14 cas familiaux) (Fukami et al., 2006). Ces résultats ont ensuite été confirmés par d'autres études qui ont montré que les mutations du gène *MAMLD1* pouvaient être associées à des hypospadias isolés de gravité variable (Chen et al., 2010; Kalfa et al., 2008). La protéine MAMLD1, dont l'homologue murin est spécifiquement exprimé dans les cellules de Sertoli et de Leydig, agit comme un co-activateur dans la voie de signalisation Notch sous la dépendance de NR5A1. L'ensemble de ces données suggère que *NR5A1* et *MAMLD1* seraient impliqués dans la sécrétion de testostérone à un moment critique du développement génital (Ogata et al., 2009).

e) Autres

Le caractère héréditaire étant le facteur de risque majeur dans la survenue d'un hypospadias, les études sur la génétique des hypospadias sont nombreuses (Thorup et al., 2014).

Kon et al. ont analysé 62 patients et ont retrouvé sept mutations dans les gènes *AR*, *BNC2*, *SRD5A2* et *HSD3B2* (Kon et al., 2015). Deux patients avaient même des mutations dans plusieurs gènes.

Bouty et al. dressent une liste exhaustive des gènes potentiellement impliqués dans la survenue d'un hypospadias (Tableau 5). Ils interviennent dans différentes voies de signalisation : ceux des gènes Hedgehog (*Hh*), des gènes de la famille des Fibroblasts Growth Factors (*FGFs*), des gènes *BMPs*, du gène *WT1* et des gènes intervenant dans la croissance du tubercule génital (*DGKK*) (Aschim et al., 2005; Beleza-Meireles et al., 2007a, 2007b, 2007c, 2008; Carmichael et al., 2012, 2013c, 2013d, 2014; Ma et al., 2015; Radpour et al., 2007; Sata et al., 2010; Thai et al., 2005, 2008; Watanabe et al., 2007; van der Zanden et al., 2011). Enfin, il semblerait que la balance entre production d'androgènes et d'oestrogènes soit intimement liée, faisant entrer en jeu les gènes de la famille *HSD*, *SRD5A2*, *AR* ainsi que les gènes *ESR1* et *ESR2* (Aschim et al., 2004a; Ban et al., 2008; Choudhry et al., 2015; Samtani et al., 2011; van der Zanden et al., 2010; Zhang et al., 2011).

	Gene	Variants	Effect	
Hedgehog pathway	<i>SHH</i>	rs9333613 (A:G)	↑ (M)	
	<i>GLI1</i>	rs10783827 (T:G), rs4760259 (C:T), rs2228226 (C:G)	↑ (M)	
		rs3825077 (G:A), rs3782126 (G:A), rs2292657 (C:T)	↓	
	<i>GLI2</i>	rs4848125 (A:G), rs4848126 (G:A)	2 ↑ (M, Cauc)	
		rs4143116 (G:A)	2 ↑ (M)	
<i>GLI3</i>	rs6974655 (G:T)	↑ (A)		
	rs9886211 (A:G)	↑ (P)		
	rs3801223 (C:T)	↑ (M)		
FGF pathway	<i>FGF8</i>	rs3218238 (G:A)	↑	
	<i>FGF10</i>	rs16901816 (T:G), rs2973644 (T:C), rs2973646 (C:A)	2 – 4 ↑ (M, Cauc)	
		rs6892212 (A:C)	3 ↑ (M, Cauc)	
<i>FGFR2</i>	c.382 + 52>G, c.550 + 27C>T, c.727 + 180T>G M186T (hetero)	↑ ↑ (M)		
BMP	<i>BMP7</i>	rs6070007 (C:A)	↑ (M)	
		rs6127978 (A:G), rs6127985 (G:A)	↑	
		rs6127980 (G:A)	↑ (P)	
WT1	<i>WT1</i>	rs12293750 (C:A)	4 ↑ (A)	
		rs1799937 (T:C), rs5030277 (T:A), rs16754 (A:G), rs5030234 (C:A), rs385449 (G:A)	↑ (P)	
Additional genes in GT patterning	<i>DGKK</i>	rs1934179 (A), rs7063116 (A)	2 ↑ (A, M)	
		rs1934179, rs7063116, rs4143304, rs9969978, rs1934190, rs1934188	↑ (A, M)	
		rs5961179, rs7882950, rs12556919, rs17003341, rs1934190, rs4143304, rs1934188, rs17328236, rs9969978, rs1934179, rs5961183, rs7876567, rs7063116	↑ (A, M)	
		rs1934183, rs6614511	↓	
Androgen production and signalling	<i>HSD3B1</i>	rs6203 (C:T)	2 – 3 ↑ (M, Hisp)	
	<i>HSD17B3</i>	rs12552648 (C:T)	↑ (M)	
		rs8190566 (A:G)	2 ↑ (P)	
		rs8190557 (C:T)	↑ (P)	
		rs2026001 (C:A)	↓ (A)	
		rs2066479	3 – 4 ↑ (P)	
	<i>SRD5A2</i>	rs1042578 (G:A), rs9332975 (A:G), rs2281546 (T:G), rs28383032 (C:T)	1, 5 ↑ (M)	
		rs6543634 (T:G), rs2268794, rs7562326 (T:C)	↑ (M)	
		rs519704 (G:A)	3 – 4 ↑ (P)	
rs725631 (C:A), rs765138 (C:A)		↓ (P)		
V89L		↓		
<i>AR</i>	V89L (G:C)	3 ↑ (P)		
	GGN repeats >22	↑ (M)		
		GGN repeats >24	↑ (M)	
Oestrogen production and signalling	<i>ESR1</i>	rs 926779 (G:A), rs 3020364 (A:G), rs 6932902 (G:A), rs 3020371 (C:T), rs 3020375 (C:A)	haplotype AGATA strongly associated	
		rs11155820 (A:G), rs3798573 (A:G), rs9479190 (A:G), rs1709183 (A:G), rs3020371 (C:T), rs2347923 (A:C), rs750686 (G:A), rs3798758 (G:T), rs3778099 (T:C), rs3020407 (A:G), rs726281, (A:G), rs7743290 (T:G), rs9397463 (C:T), rs3020364 (A:G), rs3020375 (A:C), rs6932902 (G:A), rs926777 (C:A), rs9479188 (G:A), rs11155819 (T:C), rs9340931 (T:C), rs2459107 (G:A), rs2347867 (G:A), rs6901451 (G:A), rs13203975 (G:A), rs13219476 (T:G), rs3798568 (G:A), rs3822990 (C:T), rs3778090 (C:T), rs12664544 (G:C), rs985695 (C:T), rs9340995 (G:C), s7755185 (A:G), rs2982683 (C:T)	↑ (Cauc and Hisp)	
		rs2234693 (T:C)	2 ↑ (M)	
		rs9340799 (A:G)	↓ (M)	
		<i>ESR2</i>	rs944050 (A:G)	↓ (M)
			rs944050 (A:G), rs3832949 (266_267insC)	↑
			↑ CA repeat	↑
			rs2987983 (T:C), rs10483774 (A:G), (CA)n	↑

Tableau 5. Polymorphismes associés avec la survenue d'un hypospadias en génétique humaine (Bouty et al., 2015).

Les gènes sont regroupés selon leur voie de signalisation. Dans de nombreux cas, le numéro de SNP de référence et le changement d'allèle ou de nucléotide associé sont indiqués. L'effet sur le risque d'hypospadias (augmenté ou diminué), le risque et la gravité sont également notés. Le nombre indique le risque. ↑ indique une augmentation et ↓ indique une diminution du risque d'hypospadias. A = associé à des hypospadias distaux ; Cauc = l'association n'a été trouvée que chez les Caucasiens; Hisp = l'association n'a été trouvée que dans la population hispanique; M = associé à des hypospadias moyens; P = associé à des hypospadias proximaux. La référence de chaque étude est indiquée.

4. Prise en charge chirurgicale

La prise en charge chirurgicale des enfants présentant un hypospadias dépend de la sévérité de la malformation (Castagnetti and El-Ghoneimi, 2010, 2011; Spinoit and Hoebeke, 2015).

a) Hypospadias distal

Prise en charge à la naissance

A la condition que l'anomalie corresponde bien à la description ci-dessus, il n'y a pas de modification dans la prise en charge de ce nouveau-né, par ailleurs sain. Le sexe masculin peut être affirmé, il n'y a pas lieu de demander un bilan endocrinien ni un caryotype.

Il faut toutefois proscrire toute circoncision d'ordre religieux ou hygiénique, en expliquant qu'il est nécessaire d'organiser une consultation avec un urologue pédiatre dans les semaines qui suivent la naissance afin qu'il puisse répondre aux nombreuses questions des parents et par-là même les rassurer, tout en leur indiquant qu'il s'agit d'une chirurgie délicate qui peut connaître des problèmes de cicatrisation, même si l'anomalie est peu marquée. Le programme thérapeutique est expliqué. Tout traitement androgénique semble inutile (Snodgrass et al., 2011).

Traitement chirurgical

Bien qu'il s'agisse d'un hypospadias dans sa forme mineure, la prise en charge doit être effectuée par un urologue pédiatre, familier de ces anomalies. En effet, cette chirurgie est délicate et nécessite une expérience particulière. Elle est à la fois plastique et fonctionnelle.

La date de l'intervention chirurgicale, variable selon les praticiens, est fixée entre neuf et 18 mois. L'intervention est effectuée en hospitalisation traditionnelle courte ou en hospitalisation ambulatoire.

Les gestes à effectuer doivent être adaptés à chaque cas et font appel à plusieurs techniques. La reconstruction du canal est le plus souvent nécessaire, mais parfois une simple méatoplastie suffit. Les différentes techniques ne comportent pas la section de la gouttière urétrale. Très schématiquement, il s'agit de la fermeture sur elle-même de la gouttière urétrale (Duplay avec éventuel artifice de Snodgrass) ou par apport

de tissus de voisinage (urétroplastie selon Mathieu, utilisant la peau pénienne antérieure, et urétroplastie selon Onlay, utilisant une gouttière de muqueuse préputiale vascularisée). La circoncision est le plus souvent nécessaire, mais il est parfois possible, si les parents le souhaitent, de reconstruire un prépuce circulaire (Zimmermann and Woodward, 2014). Une sonde vésicale est habituelle, mais laissée peu de temps en place (de deux à quatre jours).

Avant cette intervention, les parents doivent être prévenus des complications possibles de cicatrisation, où l'on distingue schématiquement : les fistules, sans gravité, mais contrariantes et nécessitant une reprise chirurgicale au moins six mois plus tard, et les sténoses, qu'il ne faut pas laisser en place et qu'il faut traiter par dilatation ou reprise chirurgicale.

Résultats à long terme

Des complications sont possibles et devront être confiées à des chirurgiens experts qui savent les diagnostiquer et les réparer. On peut évoquer les fistules (3,5 à 5%) et les sténoses du méat (1,5 à 3%) qui nécessitent alors une nouvelle intervention chirurgicale (Grosos et al., 2014; Hammouda et al., 2003; Hueber et al., 2015; Mousa et al., 2002; Pfistermuller et al., 2015; Spinoit et al., 2013).

b) Hypospadias proximal

Bilan endocrinien

Le bilan hormonal est systématique quel que soit le génotype. Plusieurs stéroïdes sont dosés dans le liquide amniotique : 17-OH-progestérone, delta-4-androstènedione et testostérone.

Information des parents

Il est important de proposer que les parents puissent rencontrer l'équipe multidisciplinaire spécialisée qui prendra en charge l'enfant après la naissance, en pratique l'endocrinologue et l'urologue pédiatre. L'information doit être prudente et adaptée à la compréhension des parents. Il est important d'insister sur l'importance des explorations post-natales dès la naissance.

Prise en charge à la naissance

Elle doit être considérée comme une urgence néonatale. La description des anomalies doit être la plus précise possible. De même, il est primordial de veiller à utiliser un vocabulaire neutre adapté à la situation surtout en présence des parents. On parlera plus volontiers du bébé, du bourgeon génital, des gonades et des bourrelets génitaux que de testicules ou d'ovaires, de scrotum ou de grandes lèvres, de clitoris ou de verge qui sont plus orientés.

L'arbre généalogique de la famille doit être associé à la description clinique en précisant les antécédents d'anomalie de migration testiculaire, d'hypospadias et d'hypofertilité.

Examen clinique des organes génitaux externes

Le premier geste doit rechercher par la palpation la présence de gonades au niveau des bourrelets génitaux ou au niveau inguinal. On précisera l'aspect du bourgeon génital (taille, coudure, position du méat) ainsi que le nombre d'orifices présents au niveau de la filière génitale (méat urétral, vagin, anus). Ces éléments doivent être précisés par des schémas ou des photographies, après autorisation des parents. L'examen clinique doit être complet. Il précise l'existence d'éventuelles malformations associées ou l'existence d'une dysmorphie permettant dans certains cas d'orienter le diagnostic.

En cas de palpation de gonades dans les bourrelets génitaux, il s'agit a priori plutôt d'une insuffisance de virilisation pouvant entrer dans le cadre des 46,XY DSD.

En cas de gonades non palpables, l'urgence est à la recherche d'une hyperplasie des surrénales dans le cadre des 46,XX DSD (Bouvattier and Chatelain, 2008).

Il est important de préciser que la découverte d'un hypospadias distal isolé à la naissance, le plus souvent idiopathique, ne doit pas conduire à des explorations de type ADS.

Explorations biologiques en période post-natale

Bilan endocrinien

Devant les conséquences possibles pour la déclaration du sexe de l'enfant, ce bilan est une urgence médicale et doit être pratiqué dès le premier jour de vie. Ces examens permettent d'évaluer l'activité de l'axe gonadotrope

(Hughes et al., 2012b). Les dosages à effectuer sont : glycémie, 17-OH-progestérone, testostérone, delta-4-androstènedione, LH, FSH, AMH, ACTH plutôt que le cortisol qui ne se cycle pas chez le nouveau-né.

A la fin de la première semaine de vie, il faut être vigilant sur la bonne croissance pondérale de l'enfant, son ionogramme et son taux de rénine pour éliminer un déficit minéralocorticoïde (perte de sel urinaire). Les résultats de ces examens, obtenus en 24 à 48 heures pour la plupart, permettent ensuite d'orienter le diagnostic.

Étude génétique

L'étude génétique reste l'étape primordiale à la détermination du sexe (Arboleda et al., 2014). Ces examens sont à réaliser après accord parental. Si le caryotype n'a pas été réalisé en prénatal, il le sera à ce moment, avec les mêmes exigences que ce qui aurait pu être demandé avant la naissance, notamment dans l'emploi de techniques complémentaires (FISH, CGH-Array). En cas d'étude anténatale, les résultats du caryotype et de l'étude des gènes pouvant être impliqués dans les ADS seront interprétés avec les données biologiques et phénotypiques de l'enfant (Martinerie et al., 2012).

Examens morphologiques

L'échographie reste l'examen le plus simple. Elle permet la recherche d'un utérus ou d'une cavité rétro-vésicale pouvant correspondre à un reliquat müllérien. Les autres organes sont étudiés à la recherche d'une malformation associée, en particulier une uropathie malformative ou une augmentation de la taille des surrénales.

L'imagerie par résonance magnétique avec clichés per-mictionnels peut aussi être utile dans certains cas pour repérer les organes génitaux internes.

L'urétro-cystographie rétrograde pourra être réalisée ultérieurement.

La coelioscopie n'est aujourd'hui indiquée qu'à titre interventionnelle (gonadectomie, exérèse de reliquat müllérien symptomatique). A cette occasion, c'est un appoint utile pour préciser définitivement les anomalies des organes internes, mais elle n'est pas indiquée en période néonatale.

Prise en charge chirurgicale

La réparation chirurgicale sera envisagée au cas par cas en fonction de l'anatomie locale, de l'étiologie et de l'évolution prévisible (Springer and Baskin, 2014). Il faut savoir rester prudent et ne pas promettre une reconstruction stricte des organes génitaux externe à l'aspect considéré comme « normal ». L'information des parents doit être effectuée par un chirurgien expérimenté dans le domaine qui établira avec la famille le programme thérapeutique avec une reconstruction si nécessaire entre neuf et dix-huit mois (Castagnetti and El-Ghoneimi, 2010, 2011; Mouriquand et al., 2016).

GENITOPLASTIE FEMINISANTE

La plupart du temps, il s'agit d'une hyperplasie congénitale des surrénales chez les filles virilisées (46,XX DSD). Les principes de la réparation chirurgicale comportent une vaginoplastie permettant une ouverture du sinus urogénital pour l'évacuation ultérieure des menstruations et les rapports sexuels. Une réduction du bourgeon génital est, de nos jours, très rarement effectuée. Une plastie labiale autour de l'orifice vaginal vise à reconstruire à la fois les petites et grandes lèvres (Figure 14). Les résultats sont souvent satisfaisants mais nécessitent un contrôle en période pubertaire et parfois un recours à une correction ultérieure (Willihnganz-Lawson et al., 2013).



Figure 14. De gauche à droite, aspect pré et post-opératoire à moyen et long terme d'une fille née avec hyperplasie congénitale des surrénale.

GENITOPLASTIE MASCULINISANTE

Il est parfois nécessaire d'utiliser une androgénothérapie durant les premiers mois de vie pour améliorer la trophicité de la verge (Gorduza et al., 2011; Rynja et al., 2018; Wright et al., 2013). Le prépuce étant souvent indispensable à une reconstruction, il faut informer les familles qu'une circoncision ne doit pas être pratiquée avant la chirurgie réparatrice.

Pour ces hypospadias postérieurs, où la courbure de verge est marquée et conditionne le pronostic sexuel ultérieur, le redressement adéquat de la verge nécessite la section de la plaque urétrale.

Les étapes de reconstruction peuvent s'effectuer en un ou plusieurs temps chirurgicaux en fonction de la sévérité de l'atteinte (Castagnetti and El-Ghoneimi, 2010). Deux groupes de techniques sont à distinguer parmi les quelques 300 techniques chirurgicales décrites dans la littérature :

- La section de la plaque urétrale donne de meilleurs résultats que la plicature dorsale ; un tissu d'interposition (soit préputial, soit issu de la vaginale testiculaire) est nécessaire pour réduire le taux de fistules et l'urétroplastie est alors effectuée par l'apport de lambeaux vascularisés locaux (Onlay, tube selon Duckett, uréthoplastie selon Koyanagi), et ;
- L'urétroplastie peut être effectuée par apport de muqueuse libre, vésicale ou buccale, en un ou deux temps. Le deux temps – dit procédé de Bracka - est actuellement de plus en plus utilisé avec deux chirurgies entre trois à six mois d'intervalle. Les résultats sont encourageants avec un taux de fistules entre 15 et 25% et de sténoses jusqu'à 7%.

Au total, l'hypospadias est une malformation fréquemment isolée qui ne nécessite pas de bilan complémentaire surtout dans les formes antérieures. En revanche, l'existence d'hypospadias postérieur ou associé à d'autres malformations (cryptorchidies, hernie inguinale, anomalies sévères du développement sexuel, utricule prostatique) doit conduire à des explorations complémentaires. Une prise en charge spécialisée associant pédiatres, chirurgiens, généticiens et endocrinologues doit conduire à un bilan sans délai comportant un caryotype, un bilan hormonal et des tests génétiques orientés ainsi qu'un complément d'imagerie voire un examen endoscopique. Le suivi à l'adolescence et à l'âge adulte est primordial, que ce soit en termes de résultats cosmétiques, fonctionnels et pour la fertilité future (Andersson et al., 2018; Blanc et al., 2011; Castagnetti and El-Ghoneimi, 2010; Mouriquand et al., 2016; Örtqvist et al., 2015; Spinoit et al., 2013).

Sans conséquence sur le haut appareil urinaire, l'orientation du jet et la gêne lors des rapports sexuels futurs constituent les principaux retentissements de la pathologie (Schönbucher et al., 2008). L'impact psychologique peut être important même dans les

formes mineures, ce qui conduit le plus souvent à proposer une chirurgie correctrice précoce entre 12 et 18 mois (Weber et al., 2009).

La technique de reconstruction chirurgicale a pour but de corriger la courbure de la verge, de réaliser une urétroplastie et de reconstruire le défaut ventral. Elle varie en fonction de l'expérience de l'opérateur et du type d'atteinte. Les complications ne sont pas rares. Leur taux varie en fonction du type d'hypospadias et de la technique utilisée allant de 1 à 50% dans les formes les plus sévères (Catti et al., 2009) avec souvent nécessité de recours à une chirurgie secondaire. Elles sont essentiellement représentées par les fistules et les sténoses mais aussi par les infections et les nécroses cutanées.

Dans les cas d'hypospadias postérieurs avec défaut de développement de la verge, il est proposé un traitement androgénique par voie générale (testostérone énanthate, *Androtardyl*®) afin d'améliorer la trophicité des tissus et la croissance de la verge. Néanmoins, le taux de complication post-opératoire semble plus élevé en cas d'administration d'androgènes dans les trois mois précédant l'intervention (Gorduza et al., 2011).

II. Objectifs de l'étude

L'objectif de ce travail a été d'explorer plus en détail la physiopathologie des anomalies du développement sexuel et, en particulier de l'hypospadias. Plusieurs approches ont été utilisées :

- En reprenant la théorie du *double hit* de Knudson (Collège national des enseignants et praticiens de génétique médicale (France), 2004; Erickson, 2010) selon laquelle il faut deux évènements mutationnels, un constitutionnel et un somatique, pour conduire à une pathologie, la recherche de mutations somatiques dans des gènes situés sur le chromosome X (*AR*, *MAMLD1*) ou affectés par des mutations hétérozygotes à transmission dominante (*NR5A1*) a été entreprise. L'hypothèse de départ a été que de telles mutations somatiques, touchant un allèle unique chez le garçon ou s'exprimant du fait de leur caractère dominant, pourraient avoir un effet phénotypique direct au niveau des tissus génitaux.
- En recherchant des microremaniements chromosomiques par l'étude systématique de cas de DSD et d'hypospadias en puce ADN de type SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) ;
- En étudiant une association possible entre les taux d'hormone chorionique gonadotrophique (hCG) pendant la grossesse et la survenue d'un hypospadias. L'hypothèse de départ a été que l'action masculinisante de l'hCG sur un fœtus masculin pourrait être entravée, expliquant ainsi la malformation génitale.
- En analysant par séquençage d'exome une cohorte de cas familiaux et de cas consanguins d'hypospadias.

La réalisation de ces objectifs a permis également de mettre en évidence de nouveaux gènes impliqués dans les DSD grâce à une collaboration active avec l'unité de Génétique du Développement Humain (Human Developmental Genetics Unit) du Dr. Ken McElreavey à l'Institut Pasteur.

Nos objectifs secondaires étaient donc :

- D'extraire l'ADN issu du tissu germinale (lymphocytes sanguins) et somatique (fibroblastes de prépuce et cellules urothéliales) puis de mettre au point l'amplification et le séquençage de trois gènes candidats (*AR*, *MAMLD1* et

NR5A1) dans l'étiologie de l'hypospadias afin de rechercher une différence d'expression entre cellules germinales et tissus cibles en réalisant une étude comparative de la séquence germinale et somatique des gènes choisis dans une cohorte de patients présentant un hypospadias ;

- De rechercher des CNVs chez les patients sources ;
- De créer une cohorte épidémiologique et clinique de patients évalués de la façon la plus optimale possible, que ce soit pour le recueil des antécédents, l'exposition ou non à un environnement toxique, un examen clinique détaillé et un suivi au long terme pour évaluer les techniques opératoires, et ;
- De colliger une population témoin, à savoir les enfants opérés d'une posthectomie appariés en âge et en origine géographique vraie, afin de pouvoir comparer à la fois le profil génomique sanguin en puce SNP-array ainsi que d'étudier la séquence des gènes candidats au niveau préputial.

III. Matériels et méthodes

A. Patients

Deux cent quatre-vingt-quatre patients adressés pour traitement chirurgical d'un hypospadias ont été inclus au sein des services d'urologie pédiatrique de l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (Hôpital d'Enfants Armand Trousseau, Hôpital Necker – Enfants Malades et Hôpital Universitaire Robert-Debré) entre novembre 2010 et août 2018. Les parents de ces patients ont tous bénéficié d'un entretien avec un chirurgien, un généticien (interrogatoire orienté sur les facteurs de risques génétiques) et un endocrinologue. Les patients ont eu un examen clinique détaillé au niveau des organes génitaux externes (Annexes 1, 2 et 3). Lors de l'intervention chirurgicale, dont la technique variait selon l'opérateur et la sévérité de l'hypospadias (posthectomie, urétroplastie selon Mathieu, selon Duplay-Snodgrass, selon Koyanagi ou selon Onlay - Duckett tube - Onlay avec couverture en double face), le chirurgien a noté la position du méat urétral avant chirurgie et la zone de division des corps spongieux après déshabillage de la verge pour caractériser la sévérité de l'atteinte et classer les patients en trois groupes : hypospadias antérieurs, moyens et postérieurs (Annexes 2 et 3). L'étude n'a pas modifié la prise en charge chirurgicale habituelle des patients.

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 (Annexe 4).

Des prélèvements sanguins sur tubes héparinés (caryotype) et EDTA (extraction d'ADN, séquençage, étude pangénomique) et des prélèvements périphériques par frottis urétral à l'aide d'une éponge à salive (kit Oragene DNA, DNA Genotek Inc., Kanata, Ontario, Canada) avant désinfection cutanée ainsi qu'une biopsie du prépuce (dont la taille peut varier selon la technique opératoire utilisée) ont été réalisés au bloc opératoire lors de l'anesthésie générale. La biopsie de prépuce a été fragmentée et mise en culture pour l'extraction de l'ADN tissulaire. Une analyse cytogénétique par caryotype standard, une CGH-array par puce SNP-array et une extraction d'ADN à partir des lymphocytes sanguins, du tissu préputial ou du tissu urétral pour séquençage des trois gènes candidats

AR, MAMLD1 et NR5A1 ont été réalisées. Un prélèvement sur un tube sans anticoagulant a été prélevé pour congélation en vue d'une analyse endocrinienne ultérieure.

Les parents ont été également prélevés sur EDTA pour extraction de leur ADN.

L'ensemble des données épidémiologiques, cliniques, endocrinologiques, chirurgicales et génétiques a été répertorié sur une base de données. Les données statistiques ont été recueillies et analysées par Microsoft Excel, Microsoft Office Professionnel 2019 (Microsoft France, Issy-Les-Moulineaux). Les données figurant dans les tableaux ont été écrites en moyenne pondérée par l'écart type, en médiane avec interquartile ou extrêmes entre parenthèses. La signification statistique a été fixée à une valeur $p < 0,05$. Toutes les analyses ont été effectuées avec Stata (Stata 12.1; StataCorp, College Station, TX, États-Unis).

Plusieurs cohortes de patients ont ainsi pu être constituées en fonction du type, de l'origine connue ou non et de la gravité de leur atteinte génitale.

1. Cohorte 1 : 46,XY DSD

Les patients inclus dans cette étude correspondaient à des enfants à caryotype XY présentant des malformations génitales variées associées à un hypospadias. Ils ont été recrutés au sein de l'unité de Génétique Chromosomique du Département de Génétique Médicale de l'Hôpital d'Enfants Armand Trousseau à Paris, adressés par les services de génétique clinique, d'endocrinologie pédiatrique et d'urologie pédiatrique de l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (Hôpital d'Enfants Armand Trousseau, Hôpital Necker – Enfants Malades et Hôpital Universitaire Robert-Debré) entre novembre 2010 et août 2018. Les critères d'inclusion dans cette cohorte étaient :

- Soit la présence d'un hypospadias non distal, soit moyen, soit postérieur ;
- Soit la présence d'un hypospadias distal associé à :
 - une cryptorchidie bilatérale, palpable ou non ;
 - ou la présence d'un testicule non palpable ;
 - ou une anorchidie bilatérale.

La cohorte était donc composée de patients ayant :

- Une anomalie du développement testiculaire : dysgénésie gonadique complète (CGD) ou partielle (PGD), régression gonadique, ovotestis ;
- Une anomalie de la synthèse ou de l'action des androgènes (5-alpha-réductase, CAIS, PAIS, récepteur LH, AMH) ;
- Une anomalie de la différenciation sexuelle : hypospadias proximal « isolé ».

2. Cohorte 2 : Hypospadias isolé

Les patients inclus dans cette étude ont été adressés pour traitement chirurgical d'un hypospadias distal isolé et inclus au sein du service d'urologie pédiatrique de l'hôpital d'Enfants Armand Trousseau entre novembre 2010 et août 2018. Les critères d'inclusion dans cette cohorte étaient la présence d'un hypospadias distal isolé - après examen clinique par le chirurgien et ensuite après déshabillage de la verge lors de la chirurgie correctrice - sans caractère familial du premier ou second degré à l'interrogatoire. Une cryptorchidie palpable unilatérale ne faisait pas partie des critères d'exclusion, ni la notion de procréation médicale assistée.

3. Cohorte 3 : REMAPAR

Pour la partie du travail concernant l'étude d'une relation possible entre le taux d'hCG pendant la grossesse et la survenue d'un hypospadias, nous avons utilisé également les données du registre parisien des malformations congénitales REMAPAR basé sur la population (<http://www.epopé-inserm.fr/fr/grandes-enquetes/enregistr-des-malformations-congenitales-de-paris>), qui enregistre tous les cas d'anomalies congénitales et d'anomalies chromosomiques chez les enfants nés vivants, les nouveau-nés (≥ 22 semaines de gestation) et les interruptions de grossesse. Le registre couvre la population des femmes qui vivent dans la région parisienne (Paris et sa banlieue environnante) et qui accouchent ou qui ont une interruption de grossesse dans une maternité parisienne. Le nombre annuel d'accouchements dans cette population est d'environ 38 000.

Le registre de Paris est membre du JRC-Réseau Européen de registres des malformations congénitales (<https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat>) et du Centre international d'information pour la surveillance et la recherche des anomalies congénitales (<http://www.icbdsr.org/>). Le registre suit la méthodologie d'EUROCAT et la qualité des données est régulièrement contrôlée à la fois par EUROCAT (indicateurs de qualité du lien vers le site Web) et par le Comité national des registres en France. L'examen des procédures en matière de confidentialité des données est supervisé à la fois par le Comité national des registres et par le Comité national de l'informatique et des libertés (autorisation no DR-2016-393, octobre 2016). Les données sont basées sur des dossiers médicaux et sont collectées à partir de plusieurs sources, y compris les maternités, les services de néonatalogie, de chirurgie pédiatrique, de cytogénétique et de foetopathologie.

Nous avons obtenu des données du REMAPAR pour les années 2011 - 2016. La population initiale de l'étude comprenait 3172 femmes enceintes ayant donné naissance à un nourrisson de sexe masculin né vivant avec une malformation congénitale (Figure 15).

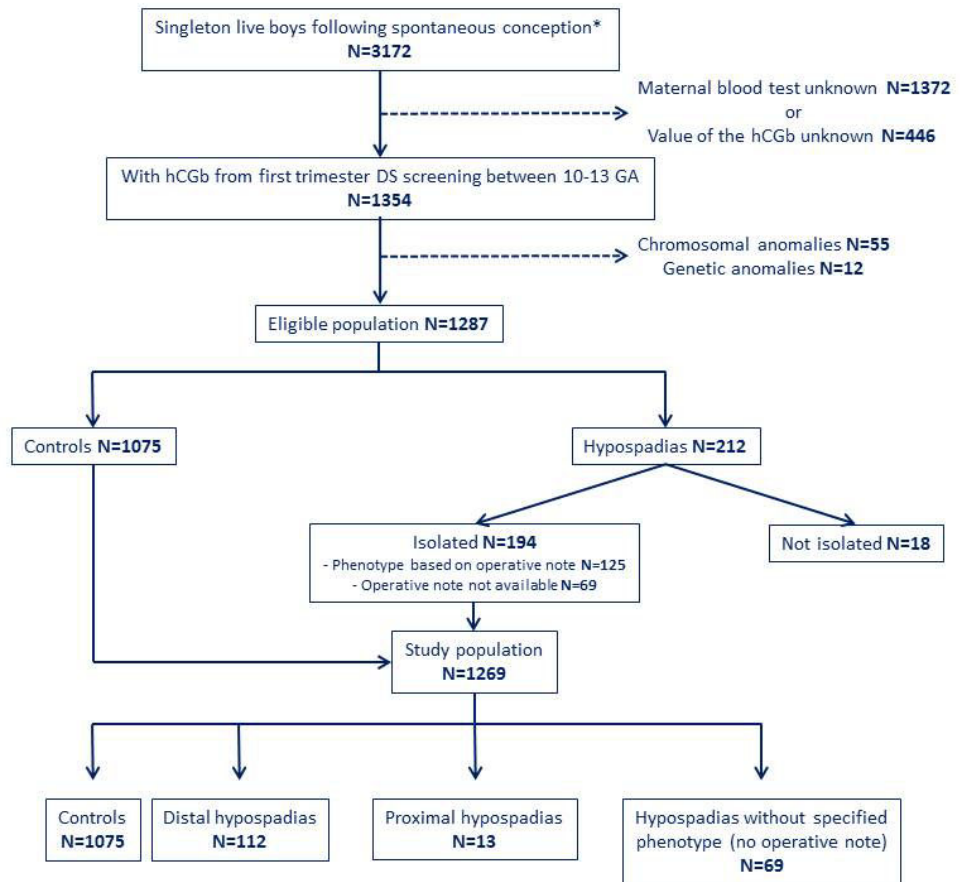


Figure 15. Caractéristiques de la cohorte REMAPAR.

*Les cas nés après PMA ont été exclus

DS, Down syndrome; GA, gestational age; hCGb, free beta-hCG; N, number.

Après exclusion des cas dont la valeur de bêta-HCG était inconnue, dont la grossesse était induite par PMA ou dont le caryotype anténatal montrait des anomalies chromosomiques ou génétiques, la population étudiée comprenait 194 garçons présentant un hypospadias isolé et 1 075 témoins. Dans les cas pour lesquels un compte-rendu opératoire était disponible (N = 125), nous avons obtenu des données sur le type d'hypospadias (proximal / distal).

Dans les cas pour lesquels une intervention chirurgicale était disponible, les hypospadias ont été classés en fonction de l'emplacement de la lésion de l'urètre, en utilisant le code Q54 de la CIM-10. Les cas ont été classés par gravité en deux phénotypes :

- Distal, comprenant les hypospadias glandulaires, balaniques (Q54.0) et péniers moyens (Q54.1), et ;
- Proximal, qui comprenait les hypospadias pénoscrotaux (Q54.2) et périnéaux (Q54.3).

Enfin, les cas pour lesquels le phénotype n'a pas pu être confirmé faute de compte rendu, ont été classés comme non spécifiés.

B. Etude génétique pangénomique

1. Historique des techniques d'analyse génétique pangénomique

En cinquante ans, depuis la découverte du nombre exact des chromosomes chez l'homme en 1956, les techniques d'analyse globale du génome, ou pangénomique, ont beaucoup évolué, allant du caryotype standard d'une résolution de 5 à 10 Mb à l'analyse chromosomique sur puce ADN ou ACPA et enfin au séquençage de l'ADN de nouvelle génération ou NGS (*Next Generation Sequencing*) portant sur le génome entier (WGS : *Whole Genome Sequencing*). La technique d'hybridation *in situ* fluorescente, ou FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), est, quant à elle, d'une grande sensibilité mais représente une approche ciblée sur une zone particulière du génome définie par la nature des sondes utilisées (Hugon, 2010). Elle reste cependant d'une aide précieuse pour vérifier les résultats obtenus par des techniques moléculaires (ACPA ou NGS) car elle donne des renseignements sur la localisation exacte des anomalies dépistées, notamment pour ce qui concerne les duplications de segments génomiques (duplications en tandem ou insertion dans un autre chromosome).

2. Technique de cytogénétique conventionnelle (caryotype)

Un caryotype standard sur lymphocytes sanguins en métaphase était réalisé en première intention. Pour cette étude, deux millilitres de sang hépariné ont été mis en culture à 37°C dans un milieu de culture Gibco Medium 199 (Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France) enrichi en glutamine et comportant un agent mitogène (phytohémaglutinine), de la pénicilline/streptomycine et 20% de sérum de veau fœtal sous

5% de dioxyde de carbone pendant 72 heures. Après culture, les cellules ont été plongées dans une solution hypotonique faite d'une solution de chlorure de potassium suivi d'une étape de fixation dans un mélange de méthanol et d'acide acétique (3:1).

Après étalement des chromosomes sur des lames de microscope, des techniques de marquage en bandes suivies d'une coloration au Giemsa ont été réalisées par dénaturation thermique ménagée pour obtenir un caryotype en bandes R (*RHG-banding : R-bands by heating using Giemsa*) et par digestion enzymatique par la trypsine pour obtenir un marquage des chromosomes en bandes G (*GTG-banding : G-bands by trypsin using Giemsa*) selon les recommandations de l'ACLF (Association des Cytogénéticiens de Langue Française) (ATC, 2000). Les chromosomes ont été ensuite observés sur des microscopes à lumière blanche équipés d'un système d'analyse d'images (Genikon) puis classés selon la nomenclature internationale de l'ISCN (*An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*), en fonction de leur taille, de leur indice centromérique et de leur morphologie (composition en bandes).

3. Analyse chromosomique sur puce ADN (ACPA)

L'ACPA repose sur le principe général de la CGH à la seule différence que la révélation de la technique s'effectue sur une puce ADN, support physique sur lequel sont fixés de très nombreux marqueurs, chacun spécifique d'une région chromosomique donnée. Cette technique permet de dépister des anomalies de nombre de copies dans l'ADN ou CNV (Copy Number Variants) avec une résolution de quelques milliers de paires de bases, contre plusieurs millions pour le caryotype classique.

Après avoir cohybridé en quantités égales un ADN témoin et l'ADN du patient marqués préalablement par des fluorochromes différents (respectivement vert et rouge) pendant 16 heures sur la puce, un scanner laser automatisé va lire les signaux et analyser informatiquement les données à l'aide d'un logiciel enregistrant l'intensité de fluorescence de l'ADN marqué par fluorochrome. Un profil de CGH où chaque point représente le ratio des signaux émis par le fluorochrome 1 et le fluorochrome 2 est obtenu. Toute déviation de la fluorescence vers le vert ou vers le rouge signera une perte de l'équiprobabilité d'hybridation des deux ADNs et donc une variation du nombre de copies dans l'ADN du patient.

Pour assurer un contrôle interne, une étude en « *dye-swap* » en inversant les fluorochromes permet d'obtenir une image en miroir signant la réalité des anomalies détectées. Une étude en trio des patients en comparant leur ADN à celui de leurs parents ou à d'autres patients n'ayant pas le même phénotype est l'autre moyen de contrôler la qualité de la CGH-array.

La caractéristique des techniques d'ACPA effectuées dans notre travail a été d'utiliser un type particulier de puces ADN, les puces « *Single Nucleotide Polymorphism* » ou puces-SNP (Andrieux, 2008) : les SNPs, pour polymorphismes nucléotidiques uniques, sont des variations d'une seule paire de base entre individus. Elles sont très fréquentes puisqu'il en existe plusieurs millions dans le génome humain. La modification d'une paire de base apparaît environ toutes les 800 paires de bases. L'analyse sur puce SNP, outre la détection de déséquilibres génomiques, permet de déterminer le génotype des patients offrant ainsi une analyse quantitative et qualitative du génome. La puce utilisée a été la puce SNP Illumina Cytochip 300K (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), techniquée au sein du Plateau technique mutualisé de Génétique constitutionnelle du GHU Est (Coordinateur Pr. J.-P. Siffroi) et dont le principe est détaillé dans l'Annexe 5 (Illumina Inc.; Keren, 2008).

Deux cents nanogrammes d'ADN extraits des lymphocytes sanguins ont d'abord été amplifiés (amplification enzymatique isothermique pangénomique à 37°C pendant 20 à 24 heures), fragmentés enzymatiquement à 37°C pendant une heure, dénaturés et déposés sur la puce pour une hybridation à 48°C pendant 16 à 24 heures. Au niveau de chaque sonde oligonucléotidique s'hybride un fragment issu de l'ADN génomique de l'échantillon étudié. Cette hybridation se fait de façon à ce que le premier nucléotide libre (non hybridé) du fragment soit le SNP. Chaque sonde oligonucléotidique subit une extension d'une seule base en se servant de la sonde comme amorce et du fragment hybridé comme matrice. Cette extension se fait par un ddNTP marqué juste au niveau du SNP lui-même. La puce est ensuite lavée de façon à déshybrider les fragments issus de l'échantillon, puis chaque SNP subit une amplification du signal à l'aide d'anticorps. Chaque SNP va donc renvoyer un signal fluorescent (rouge ou vert si homozygote, jaune si hétérozygote), dont l'intensité varie en fonction du nombre de copies.

L'analyse est ensuite réalisée sur le logiciel GenomeStudio V2010.3 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) utilisant à la fois le *Log R ratio* et le *B allele frequency* (Figure 16) :

- Le paramètre *Log R ratio* correspond à l'intensité du signal par rapport à la référence interne suivant la formule $\ln(R_{\text{test}}/R_{\text{référence}})$. Un nombre de copies normal sera à $\ln 1$ soit 0, une délétion sera à $\ln 0,5$ soit -0,69, une duplication sera à $\ln 1,5$ soit 0,4.
- le paramètre *B allele frequency* correspond à la fréquence de B et donc le génotype de chaque SNP. Un SNP A/A sera à 0, un A/B sera à 0,5, un B/B sera à 1. En cas de délétion, il y a perte d'hétérozygotie ou LOH (*Loss Of Heterozygosity*) et l'absence de SNP A/B à 0,5. En cas de duplication, les SNP A/B à 0,5 disparaissent également, mais apparaissent des SNPs à 0,33 correspondant aux A/A/B et à 0,67 correspondant aux A/B/B. La qualité est donnée par un taux noté *call rate* supérieur à 0,99.

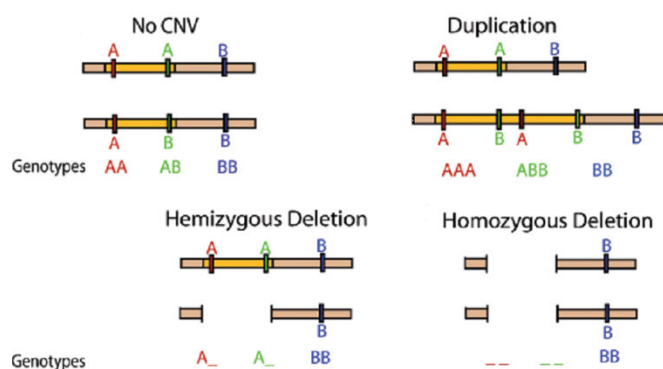


Figure 16. Représentation schématique des génotypes observés en cas de délétion ou duplication de deux SNP de type A/A et A/B.

Les variations du nombre de copies recensées sont comparées à la base de données de CNV : *Database of Genomic Variants* (DGV) (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

4. Interprétation des données d'ACPA

Les CNVs sont définis comme une séquence d'ADN de 1 Kb ou plus, présente en un nombre variable de copies par rapport à un génome de référence, réparties en trois groupes : les CNVs pathologiques, les CNVs bénins considérés comme des polymorphismes nommés CNPs (*Copy Number Polymorphism*) et les CNVs dont les conséquences cliniques ne sont pas connues ou VOUS (*Variant Of Unknown Significance*). Des bases de données publiques répertorient les CNVs, parmi lesquelles la DGV qui répertorie les CNVs polymorphes ou CNPs. L'utilisation de cette base permet donc d'éliminer les CNV considérées comme non pathogènes.

La base de données DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*) a été utilisée quant à elle pour identifier des CNVs déjà rapportés chez des sujets présentant un phénotype particulier.

Les puces SNP permettant de génotyper les patients, elles présentent l'énorme avantage par rapport aux puces classiques de mettre en évidence des régions d'homozygotie ou ROH (*Regions Of Homozygosity*), traduisant par exemple une consanguinité parfois non connue, et des disomies uniparentales. Les régions de ROHs ont donc été recherchées avec beaucoup d'attention car pouvant révéler des mutations à transmission récessive dans des gènes d'intérêt : l'ensemble des gènes présents dans ces régions a donc 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). 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" et "Genital".

C. Etude génétique ciblée

Les techniques de séquençage génomique permettent, depuis 1977 (Sanger et al., 1977), de déterminer l'ordre des nucléotides dans un fragment d'ADN cible. Elles permettent l'identification de variations génomiques au sein de la région concernée. Ces variations peuvent être pathogènes, on parle alors de mutation, ou non pathogènes, constituant alors des polymorphismes. La frontière entre polymorphisme et mutation n'est pas forcément très nette pour certaines variations car l'implication de la variation dans la pathologie peut être indirecte. L'ensemble des variations décrites sont répertoriés sur des bases de données spécifiques comme NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>).

L'identification de polymorphismes n'est pas toujours sans conséquence. D'implication parfois indirecte dans la pathologie, ils peuvent modifier la structure de la protéine, son expression ou son action correcte sur son site actif et être alors associés à certains phénotypes pathologiques.

1. ADN génomique sanguin

L'ADN sanguin des patients et de leur parents a été extrait à partir d'un prélèvement de sang total sur tube EDTA par la méthode Flexigen (Qiagen S.A.S., Courtaboeuf, France) selon le protocole détaillé joint en Annexe 6.

La qualité et la concentration d'ADN obtenue a été vérifiée par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) et par migration sur gel d'agarose à 1%.

2. ADN génomique tissulaire

L'ADN tissulaire a été extrait à partir des cultures cellulaires de fibroblastes de prépuce issues des biopsies per opératoires de la face interne du prépuce de la verge hypospade.

a) Technique de culture cellulaire

Après prélèvement opératoire, les biopsies de prépuce ont été acheminées au laboratoire pour mise en culture. Quinze à vingt fragments millimétriques de la face interne du prépuce ont été disposés par flacon de culture. Trois flacons ont ainsi été conditionnés. Le milieu de culture était composé de RPMI avec de l'Ultrosor Serum Substitute (Pall France, Saint-Germain-en-Laye, France), 10% de sérum de veau fœtal et de la vancomycine. La culture a été faite à 37°C sous 5% de dioxyde de carbone. Les cultures ont été vérifiées au microscope inversé et le milieu a été renouvelé deux fois par semaine. Lorsque la prolifération cellulaire était jugée satisfaisante, une partie a servi à la réalisation d'un culot sec (un flacon) et l'autre a été conservée en vue d'une congélation (deux flacons).

b) Technique d'extraction

L'ADN sanguin a été extrait à partir de cellules lymphocytaires sanguines (sang total des patients prélevé sur tube EDTA) par la méthode Flexigen (Qiagen S.A.S., Courtaboeuf, France) selon le protocole joint en Annexe 6.

L'ADN des fibroblastes issus de la culture de la face interne du prépuce a été extrait à partir de culots secs selon la méthode QIAamp (Qiagen S.A.S., Courtaboeuf, France) (Annexe 7).

L'ADN urétral a été extrait avec le kit Oragene Purifer selon les recommandations du fabricant et purifié par précipitation à l'acétate de sodium 3M.

En cas d'échec, les congélations cellulaires ont été utilisées et remises en culture selon le même protocole en vue d'une nouvelle extraction.

Les ADN ont été dosés par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop 1000 v3.7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) et déposés sur gel d'agarose à 1% pour évaluer leur qualité.

3. Mise au point et automatisation des réactions de PCR et de séquençage

Après mise au point manuelle des conditions d'amplification des gènes étudiés, les ADN issus des prélèvements sanguins, préputiaux et urétraux ont été techniqués robotiquement par l'automate Hamilton (Hamilton Robotics, Benaduz, Suisse) pour la réalisation des mélanges réactionnels de PCR et de séquençage. Lorsque les volumes d'ADN étaient trop faibles, les techniques de PCR et de séquençage ont été à nouveau effectuées manuellement.

a) Séquençage selon la technique de Sanger

Les gènes *AR*, *MAMLD1* et *NR5A1* ont été séquencés par les techniques de séquençage Sanger classique.

Les séquences codantes ainsi que les régions introniques flanquantes de tous les exons de ces gènes ont été étudiées. 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 en Annexes 8 à 10.

Les ADN génomiques issus des lymphocytes, des fibroblastes obtenus par mise en culture de la face interne d'un prélèvement préputial ou des cellules urothéliales par frottis doux de la gouttière urétrale (Oragene DNA 250, Ontario, Canada) ont été amplifiés par PCR à l'aide de la Taq DNA polymerase GoTaq (Promega, Madison, WI, USA) avec ou sans DMSO. Les amorces de PCR ont été choisies en dehors des polymorphismes les plus fréquents décrits et dans NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) de manière à séquencer la totalité des régions codantes et au moins 30 paires de bases des jonctions introniques flanquantes. Les conditions détaillées d'amplification sont portées en Annexes 8 (gène *AR*), 9 (gène *MAMLD1*) et 10 (gène *NR5A1*). La qualité des produits de PCR et la taille des amplicons ont été contrôlées par dépôt sur un gel d'agarose à 1% (GelRed, Life Technologies, Delhi, India). Les produits de PCR ont été purifiés par une technique enzymatique (ExoSap-IT, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

Les produits de PCR purifiés ont été séquencés par une technique de Sanger (BigDye Terminator v3.1, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) sur un séquenceur capillaire 3130XL (Applied Biosystems) après purification sur Sephadex G50 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Les amorces de séquençage ont été choisies en dehors des polymorphismes les plus fréquents décrits et dans NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) et sont disponibles sur demande. Les séquences ont été lues à l'aide du logiciel Seqscape Software v2.5 (Applied Biosystems).

b) 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 (SourceBioscience). Les exons ont été enrichis et préparés par le kit Agilent SureSelect Human All Exon v4 Paired-end puis séquencés (Illumina HiSeq2000) à l'aide du kit TruSeq v3.

Ont été ensuite générés les fichiers .fastq contenant les reads grâce au logiciel du fabricant. Les reads ont été alignés sur le génome de référence (GRCh37 ou hg19) grâce à l'outil Burrows-Wheeler Aligner (BWA) v0.7.10 pour obtenir des fichiers BAM (Binary Alignment/Map). Les reads en duplicate ont été repérés par l'outil Picard v1.107 afin de supprimer ceux amplifiés lors de l'étape de PCR. Les fichiers BAM ont été analysés par SAMtools 0.1.18. Les scores de qualité des bases ont été enfin recalibrés avec BaseRecalibrator GATK. On a alors recherché les variants SNP et Indel avec Freebayes et on a comparé à la base de données dbSNP138. Les variants ont ensuite été annotés dans la base de données Ensembl.

Les paramètres utilisés pour extraire les variants d'intérêt 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.

c) Outils bioinformatiques

Différents outils bio-informatiques et bases de données ont été utilisés pour la réalisation de ce travail. Ils sont rapportés dans le Tableau 6.

Nom	URL	Commentaires
Clustal Omega	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/	Alignement des séquences
DECIPHER	https://decipher.sanger.ac.uk	CNVs avec phénotypes
DGV	http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home	CNVs
ECR Browser	https://ecrbrowser.dcode.org	Conservation de séquences
Ensembl	https://useast.ensembl.org/index.html	Genome browser et données de SNP
Gene Expression Database	https://www.ebi.ac.uk/gxa/home	Expression des gènes dans la gonade murine
GeneCards	https://www.genecards.org	Gènes
GeneSplicer	https://ccb.jhu.edu/software/genesplicer/	Analyse de variants et de splice sites
Genome Studio Genotyping	https://www.illumina.com	Puces SNP
Genomic Oligoarray and SNP array evaluation tool	http://firefly.ccs.miami.edu/cgi-bin/ROH/ROH_analysis_tool.cgi	Gènes
Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF/	Analyse de variants et de splice sites
Mobyle@Pasteur	http://mobyle.pasteur.fr	Génération de séquences de référence
Mutalyzer	https://mutalyzer.nl	Prédiction de variants
Mutation Taster	www.mutationtaster.org	Prédiction de variants
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov	BLAST, dbSNP, Gene, OMIM et PubMed
NNSplice	https://omictools.com/nnssplice-tool	Analyse de variants et de splice sites
PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/	Prédiction de variants
Primer3web	http://primer3.ut.ee	Amorces pour PCR-séquence
RepeatMasker	http://www.repeatmasker.org	Régions répétées du génome
rVista 2.0	https://rvista.dcode.org	Conservations de séquences
SeqScape v2.5	https://seqscape.software.informer.com/2.5/	Analyse de séquence
SIFT	https://sift.bii.a-star.edu.sg	Prédiction de variants
The Human Protein Atlas	https://www.proteinatlas.org	Expression tissulaire
UCSC	https://genome.ucsc.edu	Genome browser
VISTA Enhancer Browser	https://enhancer.lbl.gov	Régions régulatrices

Tableau 6. Ressources bio-informatiques utilisées pour l'élaboration et l'interprétation des données.

d) Analyse statistique

Les données statistiques ont été recueillies et analysées par Microsoft Excel, Microsoft Office Professionnel 2019. La recherche de différence significative a été effectuée à l'aide de tests paramétriques ou non paramétriques en fonction de leur caractère catégoriel ou quantitatif. Lorsque l'effectif théorique était supérieur à 10, le test de Chi² modifié était choisi et lorsque l'effectif théorique était inférieur à 10, le test de Fisher était utilisé. Les données dans les tableaux sont écrites en moyenne pondérée par l'écart type en cas de répartition gaussienne ou en médiane avec les extrêmes entre parenthèses en cas de répartition non homogène.

La signification statistique a été fixée à une valeur $p < 0,05$. Toutes les analyses ont été effectuées avec Stata (Stata 12.1; StataCorp, College Station, TX, États-Unis).

IV. Résultats et discussion

Les résultats présentés dans ce mémoire de thèse sont encore en cours d'exploitation pour certains et n'ont donc pas tous fait l'objet de publications. Néanmoins, les données acquises permettent d'assurer une soumission pour publication très prochaine. Seront donc présentés, par grande thématique, les travaux suivants :

- Recherche de mutations somatiques dans trois gènes impliqués dans l'hypospadias (*AR*, *MAMLD1*, *NR5A1*) dans les lymphocytes sanguins et les fibroblastes de la peau du prépuce dans une cohorte de garçons avec un hypospadias ;
- Conséquence directe de l'étude ci-dessus : mise en évidence d'un nouveau mécanisme récurrent d'altération du gène *NR5A1* par duplication intragénique ;
- Recherche de microremaniements chromosomiques par l'étude systématique de cas d'ADS et d'hypospadias en puce ADN de type SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) ;
- Analyse de la relation entre le taux d'hormone chorio-gonadotrophique (hCG) dans le sang maternel et la survenue d'un hypospadias ;
- Étude de cas familiaux et/ou consanguins d'hypospadias par séquençage d'exome (WES).

A. Comparaison de la séquence du gène du récepteur aux androgènes (AR), du gène *MAMLD1* et du gène *NR5A1* dans les lymphocytes sanguins et les fibroblastes de la peau du prépuce dans une cohorte de garçons avec un hypospadias

Cette partie du travail repose sur la théorie du *double hit* de Knudson modifiée. Selon cette théorie, il faut deux évènements mutationnels, un constitutionnel et un somatique, pour conduire à une pathologie. Or, les gènes *AR* et *MAMLD1* sont portés par le chromosome X. Ils ne sont donc présents qu'en un seul exemplaire chez le garçon. Suivant le même modèle, des mutations somatiques dominantes présentes à l'état hétérozygote, comme celles affectant le gène *NR5A1*, pourraient avoir un effet phénotypique dans le tissu concerné. Par conséquent, notre hypothèse est qu'une seule mutation somatique au niveau de l'un ou l'autre de ces gènes au moment de l'embryogénèse pourrait être suffisante pour générer une anomalie du développement au niveau de la verge et conduire à un hypospadias de sévérité variable.

1. Etude du gène du récepteur aux androgènes (AR)

Le gène *AR* intervient comme un facteur crucial de la différenciation sexuelle au cours du développement, notamment pour la masculinisation. Le défaut d'action des androgènes est connu pour être en cause dans la survenue de l'hypospadias (Willingham and Baskin, 2007). De même, les facteurs environnementaux et génétiques impliqués restent encore indéterminés (van der Zanden et al., 2012). Le gène *AR* a la particularité de comporter un polymorphisme intrinsèque au niveau de l'exon 1 codant pour le domaine d'activation de la transcription (Faber et al., 1989). En effet, il existe deux zones de polymorphismes concernant des répétitions de triplets CAG et GGn dont les valeurs varient en fonction de l'origine géographique de la population étudiée (Travison et al., 2010). Par conséquent, l'altération de l'activité transcriptionnelle de la protéine AR pourrait être impliquée dans la survenue de cette malformation. Toutefois, les mécanismes moléculaires permettant d'imputer directement le nombre de ces triplets à l'action de transcription du gène sont encore inconnus (Crabbe et al., 2007).

Concernant la répétition des triplets CAG, plusieurs études retrouvent un lien entre le nombre de triplets et la survenue de certaines pathologies comme la maladie de Kennedy (Kumar et al., 2011), le cancer de la prostate ou encore le cancer du sein

(Hao et al., 2010). Certaines études ont suggéré une activité transcriptionnelle inversement proportionnelle au nombre de triplets présents dans la séquence (Beilin et al., 2000). Pour l'hypospadias, les résultats sont contradictoires avec le plus souvent une relation non démontrée de cette variation (Aschim et al., 2004a; Radpour et al., 2007). Toutefois, une étude récente concernant les cas d'hypospadias isolés retrouve une répétition plus longue des triplets CAG présents le gène *AR*. Le polymorphisme existant dans cette région est cependant si important que les effectifs doivent être très nombreux et corrélés à l'origine géographique vraie des patients. Enfin, il est nécessaire d'envisager des tests fonctionnels de la protéine *AR* pour déterminer l'implication potentielle d'une variation du nombre de triplets de la séquence codante sur fonction protéique.

Les données contradictoires concernant l'implication réelle du gène *AR* dans la survenue d'un hypospadias nous ont donc confortés dans la recherche de mutations somatiques.

a) Objectifs du travail

Les objectifs principaux consistent :

- à rechercher des mutations du gène *AR* dans une cohorte d'enfants porteurs d'un hypospadias, et ;
- à réaliser l'étude comparative de la séquence germinale et somatique du gène *AR* dans une cohorte disponible de patients présentant un hypospadias. La variation de séquence au niveau somatique pourrait expliquer une modification de l'expression ou de la fonction des récepteurs aux androgènes lors de l'embryogenèse, pour le développement des organes génitaux externes masculins.

b) Matériels et méthodes

Prélèvements

Sous anesthésie générale, au bloc opératoire lors de la chirurgie correctrice, des prélèvements sanguins ainsi qu'une biopsie de prépuce ont été réalisés.

Un prélèvement sanguin sur tube EDTA a servi à l'extraction d'ADN pour le séquençage et l'analyse pangénomique par puce SNP. Un prélèvement sanguin sur tube hépariné a permis la réalisation d'un caryotype. Un prélèvement sur un tube sans anticoagulant a également été prélevé pour congélation en vue d'une analyse endocrinienne ultérieure.

La biopsie de prépuce a été fragmentée et mise en culture pour l'extraction de l'ADN tissulaire.

Les parents ont également été prélevés sur EDTA pour extraction de leur ADN.

Matériels d'étude

ADN génomique

L'ADN sanguin des patients et de leur parents a été extrait à partir d'un prélèvement de sang total sur tube EDTA par la méthode Flexigen (Qiagen S.A.S., Courtaboeuf, France) selon le protocole détaillé joint en annexe 6. La qualité et la concentration d'ADN obtenue a été vérifiée par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) et par migration sur gel d'agarose à 1%.

ADN tissulaire

L'ADN tissulaire a été extrait à partir des cultures cellulaires de fibroblastes de prépuce issues des biopsies peropératoires de la face interne du prépuce de la verge hypospade.

Technique de culture cellulaire

Après prélèvement opératoire, la biopsie de prépuce a été acheminée au laboratoire pour mise en culture. Quinze à vingt fragments millimétriques de la face interne du prépuce ont été disposés par flacon de culture et ce dans trois flacons différents. Le milieu de culture était composé de RPMI avec de l'Ultrosor Serum Substitute (Pall France, Saint-Germain-en-Laye, France), 10% de sérum de veau foetal et de la vancomycine. La culture a été réalisée à 37°C sous 5% de dioxyde de carbone. Ces cultures ont été vérifiées au microscope et le milieu renouvelé deux fois par semaine. Lorsque la prolifération cellulaire était satisfaisante, une partie a servi à la réalisation d'un culot sec (un flacon) et l'autre a été conservée en vue d'une congélation (deux flacons).

Technique d'extraction

L'extraction proprement dite a été réalisée à partir des culots secs selon le protocole classique comportant une purification au phénol et chloroforme (Annexe 7). En cas d'échec, les congélations cellulaires ont été remises en culture selon le même protocole en vue d'une nouvelle extraction. La qualité et la concentration d'ADN obtenue ont également été vérifiées par spectrophotométrie.

Technique de PCR-Séquence

Le séquençage des exons 1 à 8 et des jonctions introniques flanquantes du gène *AR* a été effectué pour chaque patient par la méthode de Sanger. Les amorces de PCR ont été choisies en dehors des polymorphismes les plus fréquents décrits dans NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>). L'exon 1, à cause de sa taille, a été subdivisé en trois amplicons pour faciliter l'étude des répétitions de Glycine et de Glutamine.

Chaque amplicon a été amplifié par PCR à l'aide de la Taq DNA polymerase GoTaq (Promega, Madison, WI, USA) avec ou sans DMSO. Les procédures détaillées d'amplification sont données en annexe 8.

La qualité des produits de PCR et la taille des amplicons ont été contrôlées par dépôt sur gel d'agarose à 1% (GelRed, Life Technologies, Delhi, Inde).

Les produits de PCR ont été ensuite purifiés par une technique enzymatique (ExoSap-IT, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). A partir des amplicons purifiés, la réaction de séquence a été réalisée selon la technique de Sanger (BigDye Terminator v3.1, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) en utilisant des amorces de séquences différentes de celles utilisées lors de la PCR c'est à dire internes à l'amplicon et toujours en dehors des polymorphismes les plus fréquents décrits et dans NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>).

L'électrophorèse a été réalisée sur un séquenceur capillaire 3730XL (Applied Biosystems) après purification sur colonne de Sephadex G50 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Les séquences ont été interprétées à l'aide du logiciel Seqscape Software v2.5 (Applied Biosystems).

Après la mise au point manuelle des techniques et l'optimisation des conditions d'amplification et de purification, un robot de pipetage (Hamilton Robotics, Benaduz, Suisse) a été utilisé afin d'automatiser la réalisation des

mélanges réactionnels pour les PCR et le séquençage. Lorsque les volumes d'ADN étaient trop faibles ou que des séquences étaient de mauvaise qualité une première fois, les techniques de PCR et de séquençage ont été effectuées manuellement.

Séquence de référence du gène AR

Le choix de la séquence de référence pour les régions étudiées a été fait sur la base du plus long transcrit mentionné dans NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La séquence choisie était la séquence NM_000044.2 pour l'isoforme 1 du gène AR.

c) Résultats

Cohorte de patients

Le choix des patients a été établi selon le type d'hypospadias dans la cohorte constituée. Au fur et à mesure du recrutement, les étapes de recueil des prélèvements, mise en culture des fragments de prépuce, caryotypage et élaboration des culots secs et des congélations tissulaires ont été réalisées.

Sur un total de 284 patients porteurs d'un hypospadias suivis sur la période de l'étude, 33 cas ont été sélectionnés sur la base de la complétude des données les concernant (disponibilité des ADNs sanguins et tissulaires, réalisation du caryotype et de l'ACPA, disponibilité des ADNs parentaux). Ils ont été répartis en trois groupes : postérieurs (N=11), moyens (N=10) et antérieurs (N=12). Les données démographiques et cliniques pour la population étudiée sont répertoriées dans le Tableau 7.

	HYPOSPADIAS			TOTAL
	Postérieur = 11	Moyen = 10	Antérieur = 12	33
GROSSESSE				
AMP	1	1	0	2
Diagnostic anténatal	1	0	0	1
Jumeaux	1	0	0	1
Prééclampsie	4	2	2	8
NAISSANCE				
Terme (SA) moy±SD (m-M)	38,27 ± 2,27 (33 - 41)	38,22 ± 2,42 (33 - 41)	38,55 ± 2,05 (34 - 41)	38,36 ± 2,17 (33 - 41)
Poids à la naissance (g) moy±SD (m-M)	2792,27 (1550 - 4550)	2934,28 (1500 - 4600)	2922,91 (1850 - 3750)	2930,15 ± 0 (1500 - 4600)
Taille à la naissance (cm) moy±SD (m-M)	47,7 (43 - 53,5)	50,27 (43 - 57)	48,41 (41 - 57)	48,72 ± 3,8 (41 - 57)
APGAR moy±SD (m-M)	9,72 ± 0,9 (7 - 10)	9,33 (8 - 10)	10 (10 - 10)	9,7 ± 0,73 (7 - 10)
PARENTS				
Consanguinité	2	4	2	8
Age (ans) moy±SD (m-M)				
Mère	31,88 ± 4,97 (25,05 - 41,53)	35,76 ± 4,53 (28,44 - 42,25)	32,73 ± 6,09 (23,88 - 41,44)	33,36 ± 5,38 (23,88 - 42,25)
Père	36,38 ± 9,62 (30,01 - 63,56)	35,94 ± 3,28 (32,43 - 41,8)	38,14 ± 6,51 (29,37 - 51,25)	36,88 ± 6,98 (29,37 - 63,56)
Traitement maternel (progestatifs, œstrogènes, AINS, psychotrope, AHT, ATS, ARV)	5	4	6	15
Acide folique	1	2	2	5
ANTECEDANTS FAMILIAUX				
Ectopie testiculaire	0	0	2	2
Hypospadias	2	3	2	7
Hypofertilité	2	2	3	7
DONNEES PEROPERATOIRES				
Age (mois) moy±SD (m-M)	22,39 ± 5 (16,1 - 30,76)	17,3 ± 3,94 (12,43 - 25,53)	24,52 ± 14,74 (12,56 - 65,86)	21,62 ± 9,8 (12,43 - 65,86)
Poids (kg) moy±SD (m-M)	12,17 ± 2,09 (9,7 - 16)	10,51 ± 1,58 (8 - 13)	11,41 ± 3,83 (8 - 21,2)	16 ± 10,51 (1,58 - 8)
Taille (cm) moy±SD (m-M)	87,83 ± 4,11 (80 - 92)	79,91 ± 3,9 (76 - 86)	86,5 ± 14,02 (73 - 113)	84 ± 8,94 (73 - 113)
Taille du pénis (mm) moy±SD (m-M)	31,9 ± 11,62 (17 - 55)	32 ± 8,28 (23 - 45)	34 ± 5,38 (25 - 40)	32,28 ± 8,63 (17 - 55)
Testicules				
Taille (mm) moy±SD (m-M)	19 ± 4,59 (15 - 30)	19,3 ± 1,63 (15 - 20)	19,36 ± 3,35 (13 - 25)	19,22 ± 3,3 (13 - 30)
Position ectopique	2	0	1	3
Coude (n et angle en degré) moy±SD (m-M)	7 dont 6 > 30° (4NC)	10 dont 9 < 30°	5 dont 3 < 30°	22 dont 6 > 30°
Scrotum bifide	4	0	1 (1NC)	
Injections d'HCG ou de T	6	0	0	6
OPERATEURS				
GA	6	1	3	10
CG	1	7	3	11
Autres (DH, JB, CR, MC, FA, OC, ML)	4	2	6	12

Tableau 7. Données cliniques des patients hypospades inclus ayant bénéficié d'une étude génétique complète (N = 33).

AMP : aide médicale à la procréation, SA : semaines d'aménorrhées, moy : moyenne, SD : écart type, m : minimum, M : maximum, AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens, AHT : antihypertenseurs, ATS : antithyroïdiens de synthèse, ARV : antirétroviraux, HCG : hormone chorionique gonadotrope, T : testostérone

Séquençage comparatif du gène AR

Extraction d'ADN

Pour la réalisation des différentes étapes du séquençage, il était nécessaire de disposer d'au moins 60 µL de solution d'ADN avec une concentration minimum de 50 ng/µL. L'extraction de l'ADN à partir des lymphocytes sanguins était quantitativement et qualitativement satisfaisante pour le séquençage et l'étude par puce SNP chez tous les patients.

L'extraction d'ADN à partir des cultures préputiales a été possible pour 23 patients. La concentration moyenne des solutions mères était de 161 +/- 83 ng/µL (49 – 350). Le volume moyen était de 78 µL avec des extrêmes qui variaient entre 30 et 200 µL.

Dans dix cas, l'étude de l'ADN tissulaire n'a pas été effectuée pour des raisons techniques : échec des cultures (N = 8) dont un cas de contamination fongique et défaut de prélèvement per opératoire (N = 2).

PCR

Lors de l'étape de contrôle de la PCR par la migration sur gel d'agarose, la présence de bandes d'amplification aspécifiques ou l'absence de migration concluait à un échec ce qui a impliqué la réalisation d'une nouvelle procédure. Dans cette étude, l'amplification de l'exon 1 s'est révélée difficile, malgré son découpage en trois parties. L'étape de PCR de cet exon était souvent en échec malgré l'application des conditions prédéfinies dans le protocole. La température d'hybridation utilisée pour les trois parties de l'exon 1 était différente. Or, la partie nommée 1.3 semble sensible à des variations minimales de température (Figure 17).

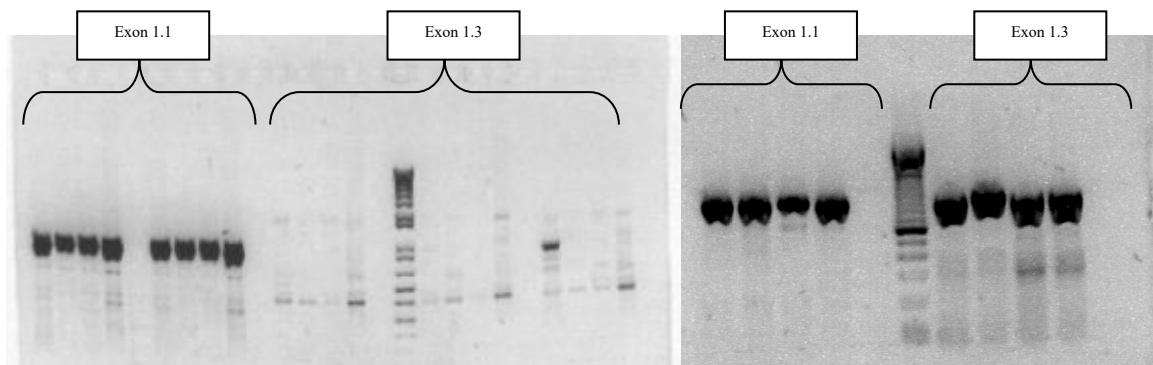


Figure 17. Exemple de migration des amplicons de PCR de l'exon 1 sur des séries de 4 patients avec marqueur de taille.

A gauche : amplification à partir d'ADN tissulaire satisfaisante la partie 1.1 et échec 1.3 avec présence de bandes aspécifiques. A droite : amplification à partir d'ADN lymphocytaire satisfaisante pour les 2 fragments.

D'autre part, les ADN tissulaires extraits à partir des culots cellulaires étaient de qualité et de concentration plus faibles que les ADN issus de prélèvements sanguins. Devant ces difficultés techniques, l'automatisation de la procédure par le robot Hamilton de l'exon 1 s'est avérée être un échec.

Résultats du séquençage

Le séquençage comparatif germinale *versus* somatique de l'ensemble du gène *AR* a été obtenu pour 23 patients. Les échecs de culture cellulaire et d'extraction n'ont pas permis l'analyse de l'ensemble de l'effectif initial. Aucune mutation dans la séquence germinale et la séquence somatique n'a été identifiée.

Les résultats obtenus sont représentés sur le Tableau 8.

Au total ont été retrouvés, dans l'ADN lymphocytaire, huit polymorphismes décrits et deux variations non décrites dans NCBI ou Ensembl :

- c.636G>A (p.Arg212Arg) est situé dans l'exon 1 et ne modifie pas l'acide aminé. Il est situé entre les deux répétitions de triplets. Il est référencé dans les bases de données comme non pathologique. Dans notre série, il est présent dans quatre cas sur dix chez les enfants porteurs d'un hypospadias moyen alors qu'il n'est retrouvé que dans un cas sur dix dans les formes postérieures et deux cas sur douze dans les formes antérieures.
- c.2607+71A>G est en aval de l'exon 7.

Nous avons également recherché une discordance entre les polymorphismes présents dans le tissu lymphocytaire et celui des fibroblastes : il n'est pas retrouvé sur notre série de variation de séquence sur les séquences des exons 2 à 8 du gène *AR* suggérant une association avec la pathologie. La corrélation entre les deux tissus pour les exons 2 à 8 est donc de 100%.

Fréquence allélique des six polymorphismes connus

La comparaison de la fréquence allélique des six polymorphismes décrits dans les exons 1, 2, 5 et 6 du gène *AR* entre notre cohorte et les données de NCBI est résumée dans le Tableau 9.

Polymorphismes	Cohorte (N = 33)	MAF (1000 genomes phase 3) (N = 2504)	p-value
c.1617-255A>G rs2361634	1/30 (3,3 %)	2 %	0,46
c.1768+204T>G rs2361635	30/33 (91 %)	< 1 %	< 0,0001
c.2318+243A>G rs5918764	30/33 (91 %)	16 %	< 0,0001
c.2318+285A>G rs56348100	3/33 (9 %)	14 %	0,61
c.2319-78T>G rs1337076	32/33 (97 %)	1 %	< 0,0001

Tableau 9. Comparaison des fréquences alléliques (MAF) des polymorphismes décrits du gène *AR* issus de populations contrôles (NCBI) et observées au sein de notre cohorte (N=33).

MAF, minor allele frequency ; N, nombre; rs, reference SNP ; SNP, single nucleotide polymorphism.

Cette comparaison a permis de mettre en évidence une différence significative pour trois polymorphismes. En effet, la fréquence est supérieure dans notre cohorte (91, 91 et 97 % contre < 1, 16 et 1 % dans la population générale, $p < 0,001$). Cependant, ces polymorphismes ne semblent pas susceptibles d'altérer l'épissage.

Étude du nombre de triplets CAG et GGn sur l'exon 1

Le séquençage de l'exon 1 a nécessité une analyse fragmentée en trois parties et l'utilisation de 12 amorces de séquence afin d'obtenir une lecture la plus optimale possible. La présence de triplets répétitifs engendre effectivement des difficultés d'alignement avec la séquence de référence du logiciel Seqscape qui comporte 22 répétitions de CAG et 23 de GGn (Figure 18). Le découpage de l'exon avait pour but une meilleure lecture et interprétation des données.

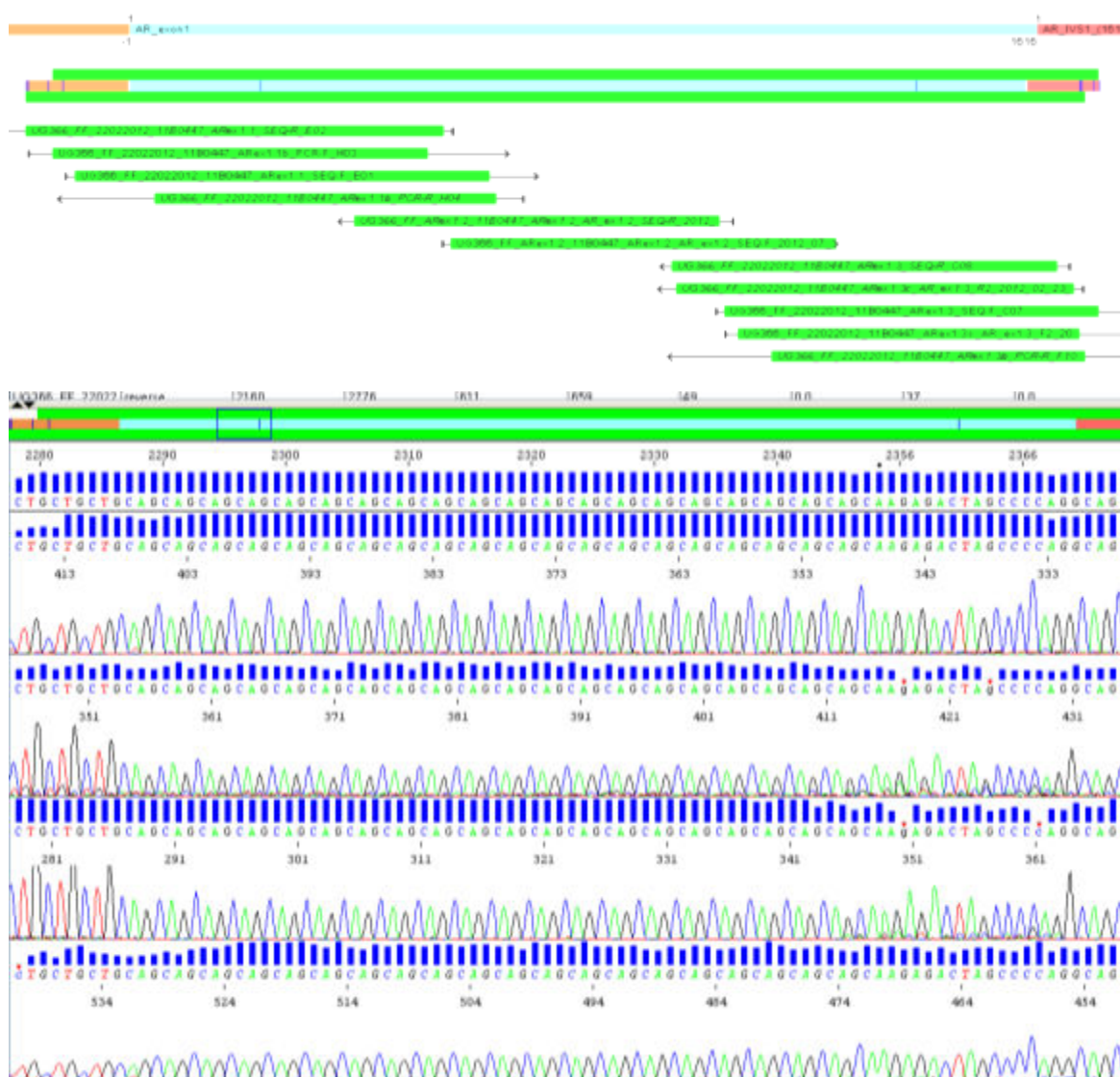


Figure 18. Exemple de résultats obtenus pour le patient 11B0447 après séquençage par le logiciel Seqscape.

En haut : Vue globale de l'analyse de l'exon 1 avec représentation de l'alignement des séquences en fonction des amorces choisies dans notre étude. En bas : Analyse de la séquence sur une zone de répétition de triplets CAG dans la première partie de l'exon, ici 20 répétitions.

L'analyse du nombre de répétitions de triplets CAG dans les tissus sanguins et fibroblastiques n'a pu être faite que chez 23 patients et celle de triplets GGn chez 19. Elle n'a pas montré de variation évidente entre la séquence germinale et somatique (Tableau 8). Le décompte du nombre de triplets était strictement identique pour 19 patients dans la séquence germinale et somatique. Quatre patients présentaient une discordance entre le nombre de triplets présents sur la séquence germinale par rapport à la séquence obtenue avec l'ADN tissulaire (Tableau 8). Un patient possédait une discordance de plus de 1 triplet entre la séquence germinale (CAG = 22) et la séquence somatique (CAG = 25). La variation du nombre de ces triplets en fonction de la sévérité de l'atteinte est représentée sur la Figure 19. Les patients sont notés de 1 à 33 en respectant l'ordre du tableau de résultats.

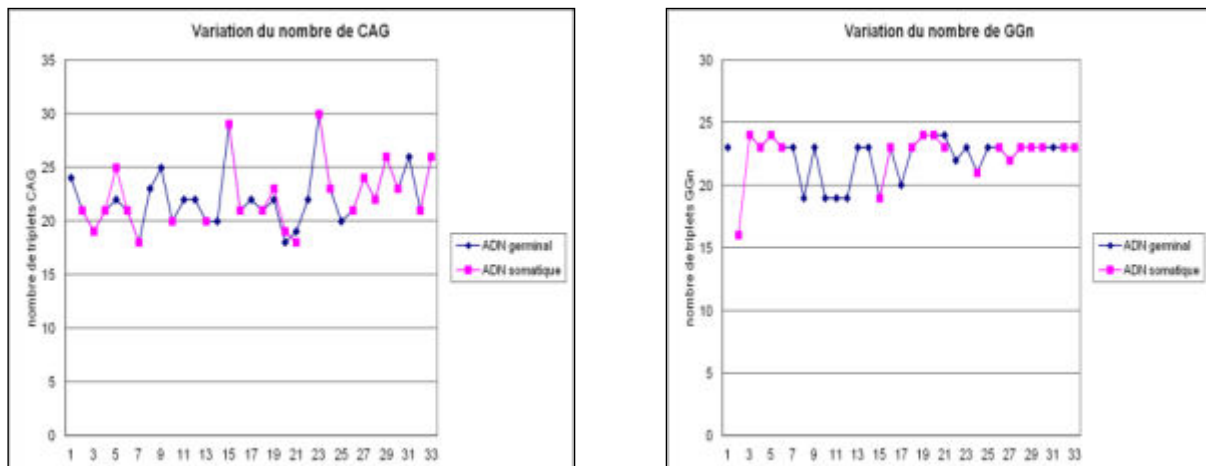


Figure 19. Représentation graphique de la variation du nombre de triplets de CAG et GGn de l'exon 1 du gène AR.

Les patients hypospades sont notés de 1 à 33 (1 à 12 : antérieurs, 13 à 22 : moyens, 23 à 33 : postérieurs)

d) Discussion

Mise au point des extractions d'ADN tissulaire

Les techniques d'extraction d'ADN sanguin (N=33) et préputial (N=23) ont été qualitativement et quantitativement satisfaisantes.

Séquençage du gène *AR* chez 33 patients

Le séquençage de l'ADN lymphocytaire et des fibroblastes issus de tissu préputial n'a pas permis d'identifier de mutations du gène *AR*. Cela peut s'expliquer par le faible effectif de notre cohorte et l'absence de sa stratification selon la sévérité de l'hypospadias. En effet, des mutations du gène *AR* ont également été identifiées chez des enfants présentant une ADS sévère, associant cryptorchidie et/ou micropénis (Kalfa et al., 2009b). Le phénotype d'une insensibilité partielle aux androgènes est variable.

Cependant, nous avons mis en évidence chez plusieurs patients des variations non décrites du gène *AR* (N=2) : c.636G>A (p.Arg212Arg) et c.2607+71A>G.

Les conséquences potentielles sur l'épissage des polymorphismes non décrits, situés dans une région codante et dans une région non codante, ont été étudiés. L'apparition ou de l'altération de sites consensus donneurs ou accepteurs d'épissage a été recherchée (analyse manuelle et à l'aide du programme MaxEntScan (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html)).

L'altération potentielle d'un site de branchement a été évaluée à l'aide du programme Human Splicing Finder 2.4.1 (<http://www.umd.be/HSF/>). Au sein du gène *AR*, le polymorphisme intronique c.2607+71A>G, situé en aval de l'exon 7, ne semble pas susceptible d'altérer l'épissage et constitue probablement un polymorphisme bénin. La seconde variation, située, dans l'exon 1, notée c.636G>A (pArg212Arg) est silencieuse et ne semble pas susceptible d'altérer l'épissage.

Au total, ces variations non décrites ne présentent pas de caractère délétère intrinsèque évident.

Fréquence allélique des six polymorphismes connus

La comparaison de la fréquence allélique des six polymorphismes décrits dans les exons 1, 2, 5 et 6 du gène *AR* entre notre cohorte et les données de NCBI est résumée dans le Tableau 9. Cette comparaison a permis de mettre en évidence une différence significative pour trois polymorphismes : c.1768+204T>G (rs2361635), c.2318+243A>G (rs5918764) et c.2319-78T>G (rs1337076) situés respectivement en amont des exons 2, 5 et 6. En effet, la fréquence est supérieure dans notre cohorte (91, 91 et 97 % contre < 1, 16 et 1 % dans la population générale, $p < 0,001$). Cependant, ces polymorphismes ne semblent pas susceptibles d'altérer l'épissage. C'est la première fois que ces trois variants précédemment décrits pourraient être incriminés dans la

physiopathologie de l'hypospadias. Une étude de la cohorte entière des 284 patients est nécessaire afin d'améliorer la puissance statistique de notre étude.

Étude de la variabilité des répétitions de triplets dans le gène AR

Par ailleurs, la taille des répétitions de CAG et de GGN codant respectivement pour des polyglutamines et des polyglycines, située au sein de l'exon 1 du gène *AR*, a été étudiée par plusieurs équipes pour évaluer son rôle dans certaines formes de DSD (Aschim et al., 2004a; Ishii et al., 2001). Déjà décrite dans la chorée de Huntington (Lunkes et al., 1998), il a été proposé que l'expansion de polyglutamine puisse conférer un gain de fonction à la protéine mutée et serait impliquée dans la mort cellulaire par un mécanisme physiopathologique probablement commun à toutes les maladies par expansion de polyglutamine. Cependant, dans l'hypospadias distal, la variation de la longueur de la répétition en CAG ne constituerait pas un facteur de risque (Ishii et al., 2001). Néanmoins, l'augmentation de la répétition en CAG semble être corrélée à un statut d'hypovirilisation sévère. Cet effet est également retrouvé dans la répétition en GGN pour un nombre de glycine supérieur à 24 et la signification de cette répétition sur la fonction protéique a été démontrée (Aschim et al., 2004a; Gao et al., 1996).

Dans notre série, le patient présentant le couple de répétition le plus faible (CAG₂₀, GGN₁₇) présentait un hypospadias glandulaire. Les autres patients présentaient un nombre de répétitions de CAG variant de 18 à 30 et un nombre de GGN de 23 ou 24 (Figure 19). Notre cohorte de faible effectif ne montre pas de corrélation entre la taille des répétitions de CAG et GGN caractérisée au niveau des prélèvements lymphocytaires et préputiaux et le type d'hypospadias.

Concernant la répétition des GGn, elle ne semble pas varier dans notre étude entre la séquence germinale et somatique comme le suggéraient les études de Aschim et Radpour (Aschim et al., 2004a; Radpour et al., 2007). L'augmentation du nombre de triplets GGn semble corrélée à une hypovirilisation surtout lorsque le nombre est supérieur à 24 (Lunkes et al., 1998). Or, dans notre série, le nombre maximal de glycines retrouvé est égal à 24 et concerne cinq patients dont aucun n'a une forme sévère. Ce mécanisme ne semblerait donc pas en cause sur les résultats préliminaires de notre série.

L'analyse comparative de la taille des répétitions de ces acides aminés dans le gène *AR* séquencé à partir d'ADN lymphocytaire et préputial de trois patients a montré une stabilité de GGN et une variabilité de CAG (expansion de deux et contraction de cinq dans les ADN de fibroblastes). Ce résultat préliminaire intéressant nécessite la

caractérisation de la variabilité sur un plus grand nombre d'échantillons de patients et sur des témoins afin d'évaluer son retentissement éventuel.

Notre hypothèse initiale, selon laquelle un évènement mutationnel pourrait survenir dans le gène *AR* au niveau du tissu urogénital n'a pas été vérifiée. Elle semble pourtant intéressante puisque l'ADN du tissu préputial fait l'objet d'études qui mettent en évidence l'activité de certains gènes du développement (Kurokawa et al., 2011; Miyagawa et al., 2011). Pour ce gène, la corrélation entre répétition de CAG et de GGN est difficile à interpréter selon les tissus car elle n'a été testée que sur un faible effectif de patients. Une étude concernant un effectif plus grand est nécessaire pour évaluer la pertinence scientifique de telles observations.

e) Limites

Population

L'étude présentée a porté sur 33 patients parmi la cohorte monocentrique de 284 cas d'hypospadias constituée entre novembre 2010 et août 2018. Tous ont été vus en consultation de génétique et ont accepté de participer au protocole. L'analyse de séquençage du gène *AR* et l'étude pangénomique complète n'ont pu être effectuées sur un effectif plus important en raison des difficultés rencontrées avec la technique d'extraction de l'ADN tissulaire après culture et en conséquence pour l'étude de biologie moléculaire. L'effectif de notre étude est insuffisant pour la réalisation d'une analyse statistique significative. Les résultats sont donc préliminaires et descriptifs (Tableau 7).

Parmi les facteurs environnementaux notables dans notre population, la prise d'un traitement maternel pendant la grossesse était impliquée dans 45% des cas. Certains traitements médicamenteux sont connus pour être des perturbateurs endocriniens (Kalfa et al., 2011a; Wang and Baskin, 2008). La mise en évidence d'un lien avec la survenue de la malformation ne peut être affirmée que par une analyse multivariée sur un effectif plus important.

La notion consanguinité a été retrouvée dans 24% des cas. L'importance de ce facteur confirme l'implication probable d'une cause génétique dans la survenue de l'hypospadias. En effet, la présence de grandes régions de perte

d'hétérozygoties dans des familles multiplex suggère la présence de mutations récessives dans un ou plusieurs gènes impliqués dans l'hypospadias. Cependant, dans cette étude, seul un cas sans antécédent familial d'hypospadias présente une consanguinité au premier degré. En cas de consanguinité plus lointaine, l'étude de ségrégation nécessite une enquête familiale avec analyse des sujets sains et des sujets atteints afin de réaliser une analyse de liaison et de repérer ainsi les régions de perte d'hétérozygotie ségrégeant avec l'hypospadias et d'y sélectionner des gènes candidats. Les prélèvements familiaux indirects de nos cas index ne sont actuellement pas disponibles pour ce type d'étude plus complexe. L'existence d'une ségrégation familiale sur des cohortes plus importante a déjà été rapportée par plusieurs études (Fredell et al., 2002; Kalfa et al., 2009a). Nos résultats, encore préliminaires, semblent confirmer cette constatation.

Les autres facteurs notables sur notre cohorte étaient l'antécédent familial d'hypofertilité et l'existence d'une prééclampsie, concernant respectivement 21% et 24% des cas. Ces constatations sont cohérentes avec les données actuelles de la littérature qui semble associer les défauts de vascularisation du placenta avec la survenue de malformations congénitales au niveau des organes génitaux externes (Yinon et al., 2010a). Il est tout de même important de souligner que les poids moyens de naissance et le terme sont normaux dans la cohorte et que ce facteur ne peut à lui seul expliquer l'anomalie.

L'aide médicale à la procréation (AMP), souvent reconnue comme facteur de risque de survenue des anomalies congénitales (Williams et al., 2010), concernait seulement deux cas dans notre cohorte. D'autre part, l'élévation de l'âge au moment de la conception peut être associée à l'augmentation de l'incidence des événements mutationnels. Dans notre série, l'âge des parents à la naissance était plus élevé dans les cas d'hypospadias moyen avec 35,7 ans en moyenne chez la mère et 35,9 chez le père.

Matériel d'étude

Le choix du tissu cible a porté sur la peau du prépuce pour des questions de facilité de prélèvement et de conditionnement. La mise en culture de ces fragments s'est avérée difficile avec survenue de plusieurs cas d'infections des cultures cellulaires. Le taux d'infection a largement diminué avec le rinçage du fragment peropératoire dans du sérum physiologique et la mise en culture la plus rapide possible après le prélèvement. L'utilisation d'une méthode d'extraction directe sur un fragment frais n'a pas été envisagée au début de l'étude, dans le but de conserver du matériel disponible

en culture. Toutefois, cette méthode permettrait certainement de diminuer le taux d'échec des cultures et le risque de contamination avec une qualité d'extraction à évaluer.

Concernant de choix du fragment mis en culture, le tissu cible le plus pathologique au cours de l'hypospadias est probablement la gouttière urétrale. Toutefois, l'utilisation d'un fragment de gouttière urétrale n'est pas envisageable au risque de compromettre la qualité de la reconstruction chirurgicale.

PCR-Séquence

La réalisation des étapes de séquençage pour un gène nécessite une mise au point avec détermination des conditions optimales d'amplification et de séquençage. Ces conditions peuvent varier en fonction du fragment concerné au sein d'un même gène. Malgré l'application des conditions pré définies pour le gène *AR*, la PCR a souvent échoué dans notre série, notamment pour les prélèvements tissulaires et l'analyse de l'exon 1 découpée en plusieurs fragments. Les études disponibles dans la littérature (Parada-Bustamante et al., 2012; Wang et al., 2004) utilisent des protocoles similaires de PCR et de séquençage à partir d'ADN issu d'un prélèvements sanguin périphériques.

Étude du gène AR

La survenue de l'hypospadias reste encore inexpliquée dans la plupart des cas. Les facteurs mis en cause sont multiples. De multiples gènes ont été rapportés comme pouvant avoir un rôle dans la survenue de la pathologie (van der Zanden et al., 2012). Le gène *AR* est un gène majeur impliqué dans la masculinisation des OGE et notamment pour le développement du pénis et de l'urètre (Kim et al., 2002). Plusieurs cas de mutations sur ce gène ont été décrits depuis 1994 (Hiort et al., 1994), comme pouvant être associés à la survenue de l'hypospadias (Wang et al., 2004). D'autre part, ce gène connaît un polymorphisme important de sa séquence notamment sur le nombre de triplets présents dans l'exon 1. Or, depuis l'étude de Chamberlain et al. en 1994, il est montré que le nombre de triplets CAG est associé à l'activité transcriptionnelle du gène *AR* (Chamberlain et al., 1994). De nombreuses pathologies acquises ou constitutionnelles montrent des variations d'une zone de répétition de triplets CAG au niveau de l'exon 1 de ce gène. Dans l'hypospadias, certaines études ne retrouvent pas d'association avec la répétition des triplets CAG mais suggèrent une répétition de GGn plus importante dans cette population (Aschim et al., 2004a; Radpour et al., 2007). Plus récemment, Parada-Bustamante et al. retrouvent une augmentation du nombre de triplets CAG chez les

patients atteints d'hypospadias en comparaison avec une population témoin (Parada-Bustamante et al., 2012). Ces résultats, encore discordants quant à l'implication potentielle de ce gène dans la maladie, nous ont conduit à le séquencer sur notre cohorte de patients hypospades.

Une étude a mis en évidence un polymorphisme en amont de l'exon 1, dans la région promotrice du gène *AR*, qui pourrait être impliqué dans la physiopathologie de l'hypospadias (Borhani et al., 2014). Adamovic et al. ont découvert un autre polymorphisme rs5919436, différent de ceux trouvés dans notre cohorte, dont l'odds ratio de susceptibilité à la survenue d'un hypospadias a été calculé à 2,98 (Adamovic et al., 2013). Nos résultats suggèrent que d'autres variants pourraient être impliqués et nécessitent une étude sur la cohorte entière.

Qiao et al. ont étudié récemment l'expression du gène *AR* et de *ZEB1* sur des cultures de fibroblastes de prépuce chez des individus hypospades (Qiao et al., 2012). *ZEB1* est un facteur de transcription agissant dans le noyau cellulaire. Son activité est influencée par la concentration en œstrogènes et semble intervenir dans la régulation de l'expression du gène *AR* au niveau des cellules préputiales. Les résultats retrouvent une augmentation de l'expression du gène *AR* associée à la sévérité de l'hypospadias. De même, l'exposition aux œstrogènes, connue comme favorisant la survenue des hypospadias, semblerait favoriser l'interaction entre *ZEB1* et *AR*.

2. Étude du gène *MAMLD1*

Sur la base d'observations de délétions de la région Xq28 sur le bras long du chromosome X emportant le gène *MTM1* (*Myotubularin 1*), responsable de myopathie myotubulaire, chez des patients présentant des malformations génitales, le gène *CXorf6* (*Chromosome X open reading frame*), voisin de *MTM1*, a été impliqué dans la survenue d'un nombre important de cas de DSD et notamment d'hypospadias (Fukami et al., 2006; Kalfa et al., 2008). Ce gène dénommé ensuite *MAMLD1* (*MasterMind-Like Domain containing 1*) est impliqué dans la production de testostérone par les cellules de Leydig fœtales (Ogata et al., 2009).

Entre novembre 2010 et août 2018, 284 patients ont été inclus dans notre étude. Les vingt premiers, par ordre chronologique, ont pu bénéficier d'une analyse complète incluant le séquençage de ce gène candidat à partir de l'ADN issu d'un prélèvement sanguin et issu d'une biopsie préputiale.

a) Extraction d'ARN et transcription inverse-PCR (RT-PCR)

La séquence du transcrit de référence du gène *MAMLD1* étant discordante entre les études publiées (Brandão et al., 2011; Chen et al., 2010; Fukami et al., 2008; Kalfa et al., 2008; Nakamura et al., 2011; Ogata et al., 2009) et celles disponibles sur NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), il a été nécessaire de réaliser une étude préalable du transcrit mature de ce gène majoritairement exprimé dans le tissu d'intérêt à partir des fibroblastes humains en culture issus d'un prélèvement de la surface interne d'un prépuce d'un individu témoin. Pour chaque échantillon témoin, l'ARN des fibroblastes a été extrait à partir d'une culture de la face muqueuse du prépuce de 25 cm² entretenue dans un milieu contenant du RPMI avec de l'Ultrosor Serum Substitute (Pall France, Saint-Germain-en-Laye, France), 10% de sérum de veau fœtal et de la vancomycine. Les ARN ont été extraits par le réactif RNA-PLUS (Qbiogene, Illkirch, France) en suivant les recommandations du fabricant.

La RT a été réalisée avec la trousse ImProm-II (Promega, Madison, WI, USA) à partir d'un microgramme d'ARN préalablement traité à la DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La RT a été réalisée à l'aide d'oligo dT afin de sélectionner les transcrits matures polyadénylés.

Les amorces ont été choisies dans des séquences codantes correspondant aux trois isoformes de *MAMLD1* décrites dans NCBI (Annexe 9 pour leur localisation et leur séquence), à savoir NM_001177465.1, NM005491.3 et NM_001177466.1. Les PCR ont été réalisées avec la Taq ThermoPrime (Fisher Scientific, Illkirch, France) selon les recommandations du fabricant en adaptant les temps d'élongation à la taille des amplicons (40 cycles d'élongation). Un témoin d'amplification a été réalisé à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques de la bêta actine humaine

5'-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3' / 5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3' (20 cycles).

Les séquences correspondant au gène *MAMLD1* et à sa protéine sont incluses dans les annexes 9 et 12 (séquence codante, traduction protéique, choix des amorces de PCR et de séquence et alignement protéique interespèce).

b) Caractérisation préalable des transcrits MAMLD1 exprimés au niveau uro-génital

Les trois isoformes du gène *MAMLD1* décrites dans NCBI et l'isoforme étudiée au sein de la littérature diffèrent dans le nombre de leurs exons et la nature de leurs séquences codantes (Figure 20) :

- NM_001177465.1 pour l'isoforme 1 composé de 5 exons notés 0, 1, 3, 6 et 7 ;
- NM005491.3 pour l'isoforme 2 composé de 6 exons notés 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ;
- et NM_001177466.1 pour l'isoforme 3 composé de 5 exons notés 1, 3, 4, 5 et 6.

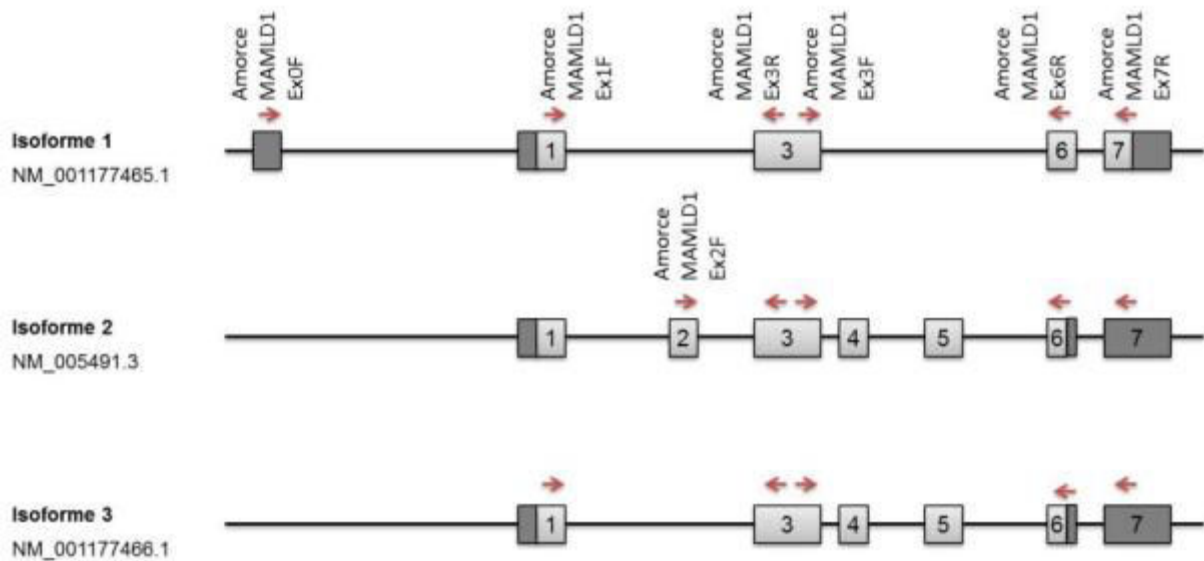


Figure 20. Représentation schématique des isoformes du gène *MAML1* décrites dans la base de données NCBI.

L'isoforme 2, retenue comme isoforme de référence, comporte 7 exons dont 6 codant pour une protéine de 774 acides aminés. L'isoforme 1 ne comporte pas les exons 2, 4 et 5 mais comporte un exon non codant supplémentaire en amont; elle code pour une protéine putative de 998 acides aminés. L'isoforme 3 ne comporte pas l'exon 2 et code pour une protéine de 749 acides aminés. Les régions codantes sont représentées en gris clair et les régions non codantes (5' et 3' UTR) en gris foncé. Les flèches rouges indiquent la localisation des amorces utilisées pour caractériser les transcrits par RT-PCR à partir d'ARNs contrôles issus de fibroblastes de tissu préputial. (Ex : exon ; F : *forward* ; R : *reverse*).

Afin de déterminer les régions codantes et les exons qu'il convenait de séquencer, nous avons réalisé l'étude des transcrits matures de *MAML1* exprimés au niveau uro-génital. L'étude du transcrit majoritaire *MAML1* a été réalisée à partir d'ARN extrait d'un tissu cible témoin, à savoir le prépuce d'un individu sain obtenu après posthectomie. Après vérification de la qualité de l'ARN sur gel d'agarose, une réaction de transcription inverse (RT) a été réalisée à l'aide d'oligo dT afin de sélectionner les transcrits matures polyadénylés. L'ADNc obtenu a été amplifié par plusieurs combinaisons d'amorces exoniques permettant d'amplifier des fragments de l'ensemble des isoformes décrites (Figure 21). Nous avons mis en évidence un transcrit majoritaire comportant les exons 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 et un transcrit minoritaire dépourvu de l'exon 4 et non décrit dans la littérature (Figure 22).

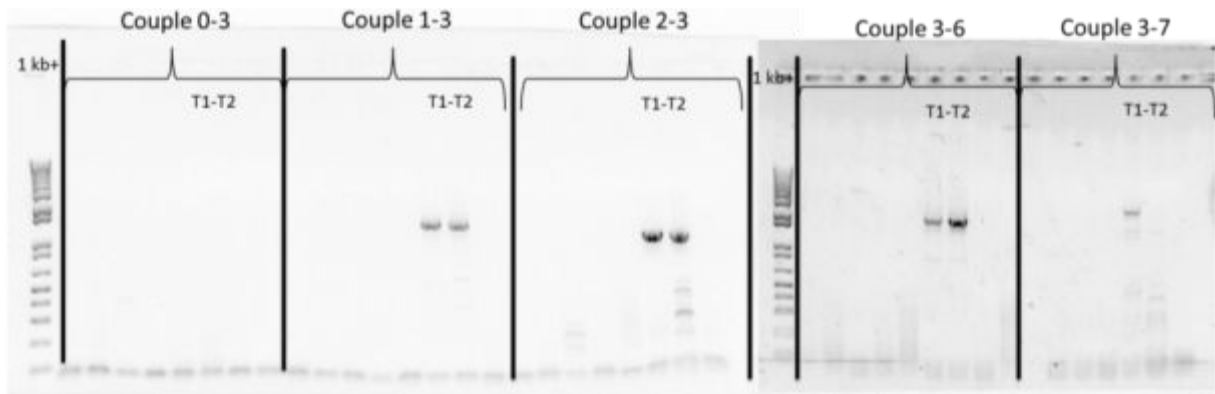


Figure 21. Migration en gel d'agarose des produits de RT-PCR du gène *MAMLD1* obtenus à partir de deux ARN témoins (T1 et T2) issus de cultures de fibroblastes de prépuce.

L'étape de transcription inverse a sélectionné les transcrits matures polyadénylés grâce à l'utilisation d'oligo dT. L'amplicon 0-3 n'a pas été amplifié ; les amplicons 1-3, 2-3, 3-6 et 3-7 ont été amplifiés et séquencés. Marqueur de taille 1 kb+.

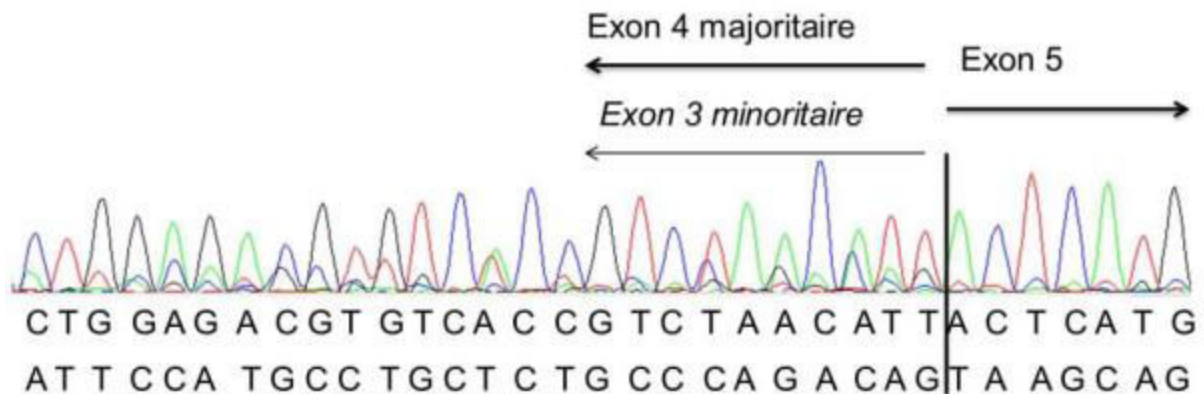


Figure 22. Electrophorégramme correspondant au produit de RT-PCR de *MAMLD1* généré à partir d'ARN de fibroblastes préputiaux par le couple 3-6 et séquencé avec l'amorce 6R.

Le séquençage a mis en évidence une isoforme majoritaire contenant l'exon 4 et une isoforme minoritaire (non décrite) dépourvue de cet exon.

c) Séquences de référence

La séquence de référence et les régions étudiées ont été choisies sur la base du transcrit le plus long mentionné dans NCBI et du résultat de l'étude des transcrits réalisée pour *MAMLD1* : NM_005491.3 pour l'isoforme 2 du gène *MAMLD1*.

d) Séquençage de l'ADN lymphocytaire

Le séquençage du gène *MAMLD1* à partir de l'ADN lymphocytaire n'a mis en évidence aucune mutation susceptible d'expliquer le phénotype des patients. Le Tableau 10 rassemble les données génotypiques obtenues et l'ensemble des polymorphismes (décrits et non décrits) identifiés chez les 20 patients au sein des séquences codantes et des régions introniques flanquantes du gène *MAMLD1* à partir des trois types de tissus.

Au total, pour *MAMLD1*, dix polymorphismes ont été décrits et deux variations non décrites situées en amont de l'exon 3 : c.172-118T>C et c.172-114C>G.

Exon	Lymphocytes						Fibroblastes de prépuce						Cellules urothéliales																												
	Polymorphisme décrit					VND	Polymorphisme décrit					VND	Polymorphisme décrit					VND																							
	1	2	3	4	5	3	1	2	3	4	5	3	1	2	3	4	5	3																							
Patients	c.1-227C>T = rs6526056	c.1-103T>c = rs6526057	c.97-190T>C = rs507156	c.97-169A>C = rs622730	c.156A>G = rs16996606	c.1077C>T = rs41313406	c.118-150A>G = rs6526082	c.1895A>G = rs2073043	c.2284+8A>T = rs5970317	c.2284+229G>A = rs143635208	c.172-118T>C	c.172-114C>G	c.1-227C>T = rs6526056	c.1-103T>c = rs6526057	c.97-190T>C = rs507156	c.97-169A>C = rs622730	c.156A>G = rs16996606	c.1077C>T = rs41313406	c.118-150A>G = rs6526082	c.1895A>G = rs2073043	c.2284+8A>T = rs5970317	c.2284+229G>A = rs143635208	c.172-118T>C	c.172-114C>G	c.1-227C>T = rs6526056	c.1-103T>c = rs6526057	c.97-190T>C = rs507156	c.97-169A>C = rs622730	c.156A>G = rs16996606	c.1077C>T = rs41313406	c.118-150A>G = rs6526082	c.1895A>G = rs2073043	c.2284+8A>T = rs5970317	c.2284+229G>A = rs143635208	c.172-118T>C	c.172-114C>G					
10B1665	T	C	C			G							T	C	C										ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
10B1730	T	C	C			G							ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10B1733	T	C	C			G				A			T	C	C											ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10B1738	T	C	C			T	G	G			C	C	T	C	C											ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10B1748	T	C	C	C		G				A			ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10B1794	T	C	C			G	G						T	C	C											ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10B1868	T	C	C			G							T	C												ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
10B1871	T	C	C			G							T	C	C											ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10B1905	T	C				G							T	C												ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10B1910	T	C				G							T	C												ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10B1911	T	C				G							ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
10B1931	T	C				G							T	C												T	C														
10B2004	T	C	C			G				A			T	C	C											T	C	C													
11B0034	T	C				G				A			T	C												ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11B0041	T	C	C	G		G				T	A		T	C	C											ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11B0095	T	C				G							T	C												ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11B0096	T	C	C			G							T	C	C											ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11B0106	T	C	C			G				A			T	C	C											ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11B0109	T	C	C			G				A			T	C	C											ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11B0117	T	C	C			G							T	C	C											ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tableau 10. Résultat du séquençage du gène *MAMLD1* à partir d'ADN de lymphocytes, de fibroblastes de prépuce et de cellules urothéliales chez vingt patients avec hypospadias.

VND : variation non décrite, ND : non déterminé, en gras : résultat discordant entre les types tissulaires.

e) Séquençage de l'ADN des fibroblastes issus de tissu préputial

Les biopsies de prépuce ont été mises en culture afin d'obtenir des fibroblastes, qui ont été stockés en culot sec ou congelés à -80°C . L'extraction d'ADN à partir des biopsies préputiales a permis d'obtenir une concentration moyenne de $74 \pm 24 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (31 - 180) dans un volume moyen de $78 \pm 38 \mu\text{L}$ (10 - 300). Une des cultures a échoué en raison d'une contamination fongique du prélèvement.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 10. Aucune mutation n'a été mise en évidence.

Nous avons recherché une discordance entre les polymorphismes présents dans le tissu lymphocytaire et celui des fibroblastes. Pour le gène *MAMLD1*, sur les 17 patients ayant eu une extraction d'ADN de fibroblastes, la corrélation pour huit polymorphismes était de 100% ; les SNPs c.97-190T>C et c.1077C>T ont une corrélation respectivement de 92% (N=12) et 50% (N=2).

f) Séquençage de l'ADN du tissu urétral

En raison du faible nombre de cellules recueillies par frottis urétral, ce type de prélèvement a été difficilement exploitable (Figure 23), avec un mauvais rendement d'extraction et des rapports d'absorbance médiocres au spectrophotomètre.

Par modification de la technique de prélèvement (frottis plus appuyé sans provoquer de saignement) et en précipitant la solution d'ADN obtenue avec de l'acétate de sodium 3M, nous avons obtenu un matériel amplifiable par PCR (Figure 24). En raison de la faible quantité d'ADN, le séquençage du gène *MAMLD1* n'a pu être faite que chez deux patients (Tableau 10). La concordance entre les cinq polymorphismes retrouvés dans le sang et dans le tissu urétral est de 100% pour ces deux patients.

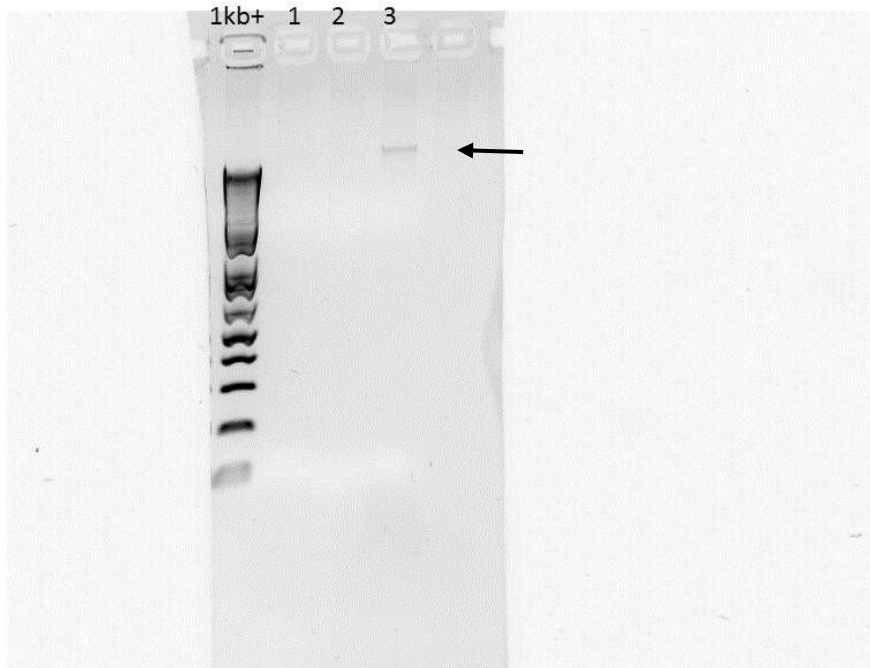


Figure 23. Dépôt en gel d'agarose 1% de l'ADN génomique issu du frottis urétral. Marqueur de taille 1kb+. Échec pour le patient 1 dont le profil spectrophotométrique était plat ; concentration faible pour le patient 2 ; bande visible, marquée par une flèche pour le patient 3.

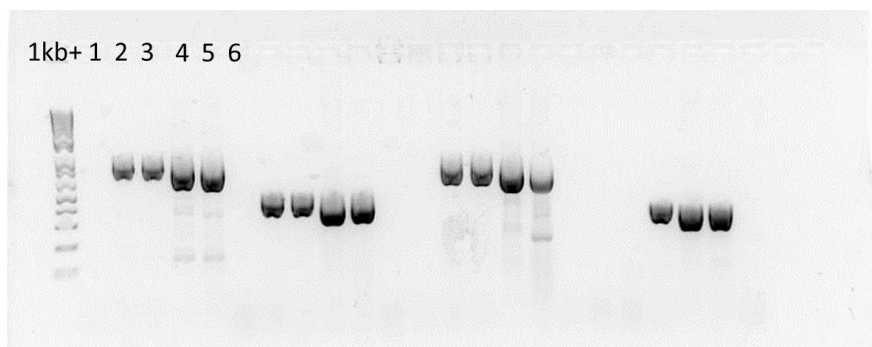


Figure 24. Dépôt en gel d'agarose 1% des produits de PCR des exons 1, 2, 3.1 et 3.2 du gène *MAMLD1* à partir d'ADN issu de cellules urothéliales (1 à 3) et de fibroblastes (4 à 5). Témoin négatif (6).

g) Discussion

Caractérisation de l'isoforme d'intérêt de MAMLD1.

Alors que les gènes *AR* et *NR5A1* sont bien décrits dans la littérature, les données retrouvées dans PubMed et NCBI pour le gène *MAMLD1* sont discordantes (Chen et al., 2010; Fukami et al., 2006, 2008; Laporte et al., 1997; Ogata et al., 2009). En effet, historiquement ont été décrites une isoforme notée 1 comportant

cinq exons puis une autre isoforme (non référencée dans les bases de données) composée de quatre exons. Les isoformes 2 et 3 étaient également décrites dans la base de données NCBI. Aussi, il a été nécessaire de réaliser une étude préalable du transcrit majoritaire par reverse transcription du gène *MAMLD1* obtenus à partir de deux ARN témoins issus de culture de fibroblastes de prépuce. Elle a mis en évidence un transcrit correspondant à l'isoforme 2 comportant les exons 1 à 7 (Figure 20), codant pour une protéine de 774 acides aminés. Le choix de cette isoforme a été conforté par l'alignement protéique interespèce (Annexe 12) qui montre une homologie la plus élevée pour l'isoforme 2 humaine. Ce résultat est important puisqu'il modifie la nature des régions codantes devant être séquencées par rapport aux précédents travaux publiés. En outre, un transcrit minoritaire dépourvu de l'exon 4 a été mis en évidence sur l'électrophorégramme du produit de RT-PCR de *MAMLD1* généré par le couple 3-6 (Figure 22). Ce nouveau transcrit correspondrait une protéine tronquée de 41 acides aminés, sans décalage de phase (l'exon 4 manquant est constitué d'un multiple de trois paires de bases).

Mise au point des extractions d'ADN tissulaire

Les techniques d'extraction d'ADN sanguin (N=20) et préputial (N=17) (à l'exception d'échec par contamination fongique du prélèvement initial) ont été qualitativement et quantitativement satisfaisantes. En revanche, l'extraction d'ADN à partir de frottis urétral (N=2) a présenté un rendement faible et peu reproductible. La méthode d'extraction recommandée par le fabricant et la technique classique au phénol – chloroforme n'ont pas été satisfaisantes ; une tentative d'amplification pangénomique (GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) a résulté en un ADN dégradé probablement polymicrobien. L'amélioration du rendement de l'extraction a été obtenue principalement par une modification de la réalisation du frottis : recueil plus appuyé, sans aller jusqu'au saignement, source d'une potentielle sténose urétrale.

Séquençage de MAMLD1 chez 20 patients

Le séquençage de l'ADN lymphocytaire, des fibroblastes issus de tissu préputial et du tissu urétral n'a pas permis d'identifier de mutations du gène *MAMLD1*. Cela peut s'expliquer par le faible effectif de notre cohorte et l'absence de sa stratification selon la sévérité de l'hypospadias. En effet, les mutations connues du

gène *MAMLD1* est impliqué dans l'hypospadias dans 3/166 individus par des mutations non-sens (Fukami et al., 2006). Cependant, nous avons mis en évidence chez plusieurs patients deux variations introniques non décrites du gène *MAMLD1*. Les conséquences potentielles sur l'épissage des polymorphismes non décrits, tous situés dans des régions non codantes, ont été étudiés. L'apparition ou de l'altération de sites consensus donneurs ou accepteurs d'épissage a été recherchée (analyse manuelle et à l'aide du programme MaxEntScan (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html)). L'altération potentielle d'un site de branchement a été évaluée à l'aide du programme Human Splicing Finder 2.4.1 (<http://www.umd.be/HSF/>) : les deux polymorphismes c.172-118T>C et c.172-114C>G sont situés en amont de l'exon 3 dans une zone riche en CT ; ils ne créent pas de site d'épissage et n'altèrent pas le site de branchement de l'intron.

Au total, ces variations non décrites ne présentent pas de caractère délétère intrinsèque évident.

3. Étude du gène *NR5A1*

Notre travail sur la recherche de mosaïques somatiques dans des gènes impliqués dans l'hypospadias s'est poursuivi par l'étude du gène *NR5A1* dont les mutations responsables de DSD sont à transmission dominante : l'apparition d'une mutation somatique pourrait donc avoir un effet phénotypique direct au même titre que les gènes portés par le chromosome X chez le garçon.

a) Cohorte

Entre novembre 2010 et août 2018, 284 patients ont été inclus dans notre étude. Un groupe de 35 patients témoins hospitalisés pour posthectomie ont composé le groupe contrôle. Les vingt premiers, par ordre chronologique, ont pu

bénéficier d'une analyse complète incluant le séquençage du gène *NR5A1* à partir de l'ADN issu du prélèvement sanguin et de l'ADN préputial.

b) Séquences de référence

La séquence de référence et les régions étudiées ont été choisies sur la base du transcrit le plus long mentionné dans NCBI : NM_004959.4 pour le gène *NR5A1* qui n'a qu'une seule isoforme décrite. La séquence correspondant au gène *NR5A1* et à sa protéine sont incluses dans les annexes 10 et 13 (choix des amorces de PCR et de séquence et alignement protéique interspèce).

c) Résultats

Séquence du gène NR5A1

L'étude du séquençage du gène *NR5A1* dans notre cohorte a retrouvé une duplication dans l'ADN lymphocytaire qui sera présenté à la suite de ce chapitre.

Au total, pour *NR5A1*, huit autres polymorphismes et une seule variation non décrite 5 (c.1139-79G>A) située en amont du dernier exon ont été également identifiées.

Grâce aux données de NCBI sur les fréquences alléliques ou MAF (*minor allele frequency*) des SNP les plus fréquents du gène *NR5A1* retrouvées au sein de population contrôles, nous avons comparé la fréquence de ces polymorphismes dans la population générale et dans notre cohorte de ce gène (Figure 25). Le polymorphisme c.437G>C (rs110061) de l'exon 4 est retrouvé à une fréquence très significativement inférieure dans notre cohorte (7,5% au lieu de 31,1%, $p = 0,007$).

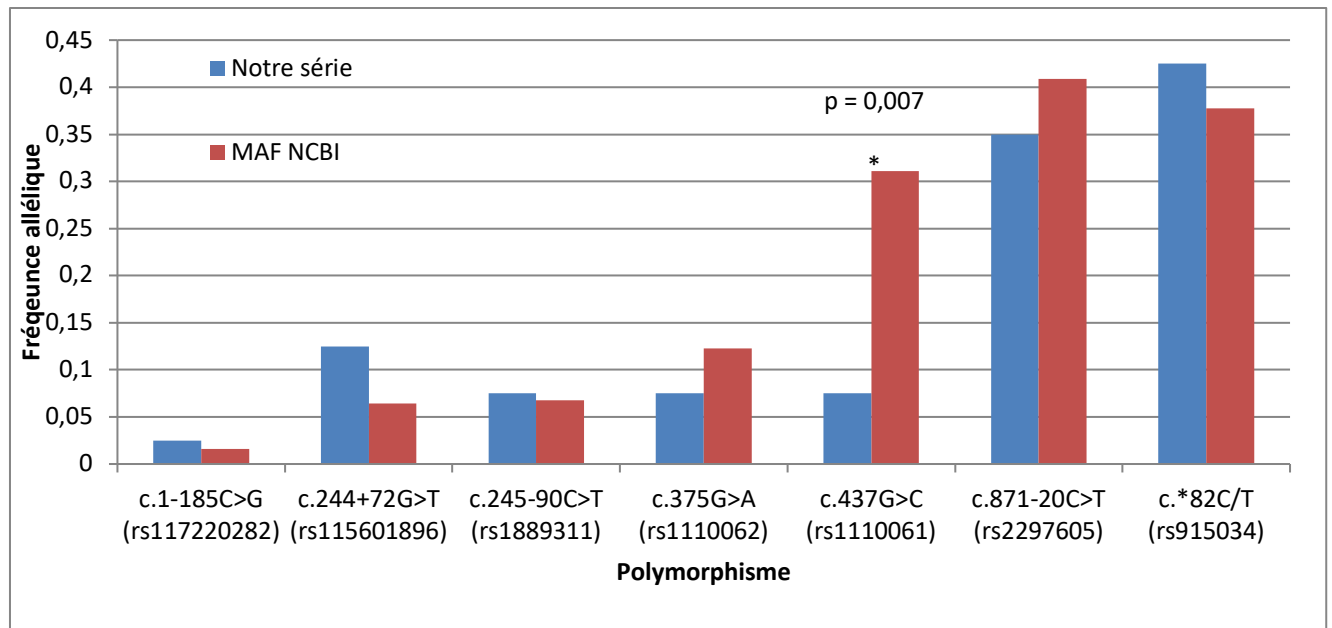


Figure 25. Représentation comparative des fréquences alléliques (MAF) des polymorphismes du gène *NR5A1* issus de populations contrôles (NCBI) et observées au sein de notre cohorte (N=20).

Comparaison des séquences germinales et somatiques issues du séquençage de l'ADN des fibroblastes issus de tissu préputial

Les biopsies de prépuce ont été mises en culture afin d'obtenir des fibroblastes, qui ont été stockés en culot sec ou congelés à -80°C . L'extraction d'ADN à partir des biopsies préputiales a permis d'obtenir une concentration moyenne de $74 \pm 24 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (31 - 180) dans un volume moyen de $78 \pm 38 \mu\text{L}$ (10 - 300). Une des cultures a échoué en raison d'une contamination fongique du prélèvement.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 11. Aucune mutation n'a été mise en évidence.

Nous avons recherché une discordance entre les polymorphismes présents dans le tissu lymphocytaire et celui des fibroblastes. Pour *NR5A1*, 18 patients sur les 20 étudiés ont eu une extraction d'ADN à la fois à partir des lymphocytes et des fibroblastes : chez ceux-ci, la corrélation est totale pour cinq polymorphismes ; les variations c.244+72G>T, c.871-20C>T et c.*172delG ont une corrélation respectivement de 66% (N=3), 90% (N=10) et 70% (N=10), le dernier polymorphisme étant cette fois-ci plus présent au sein de l'ADN des fibroblastes. La variation c.1139-79G>A, non décrite dans NCBI ou Ensembl, située dans l'intron 6 a été mise en évidence sur l'ADN lymphocytaire du patient 10B1748 mais n'a pas pu être recherchée au niveau de l'ADN de ses fibroblastes pour des raisons techniques.

Exon	Lymphocytes						Fibroblastes de prépuce									
	Polymorphisme décrit					VND	Polymorphisme décrit					VND				
	2	3	4	5	7 (3'UTR)	6	2	3	4	5	7 (3'UTR)	6				
	c.1-185C>G = rs117220282	c.244+72G>T = rs115601896	c.245-90C>T = rs1889311	c.375G>A = rs1110062	c.437G>C = rs1110061	c.871-20C>T = rs2297605	c.*82C/T = rs915034	c.*172delG = rs5900617	c.1139-79G>A							
Patients																
10B1665	T	C/T	G/A	G/C		C/T	delG+/-									
10B1730						C/T										
10B1733						C/T	C/T	delG+/-								
10B1738																
10B1748	T	C/T	G/A	G/C		C/T		G/A		T	C/T	G/A	C	ND	ND	ND
10B1794						C/T	C/T	delG+/-					C/T	C/T	delG+/-	
10B1868						C/T	C/T	delG+/-					C/T	C/T	delG+/-	
10B1871	C/G					G/C	C/T	C/T		C/G			G/C	C/T	C/T	delG+/-
10B1905						C/T	T						C/T	T	delG+/-	
10B1910						T	T	delG+/+					T	T	delG+/+	
10B1911						T	T	delG+/+		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10B1931																
10B2004																
11B0034																
11B0041	G/T	C/T	G/A	G/C	C/T	T	delG+/+			C/T	G/A	G/C		T	delG+/+	
11B0095																
11B0096						C/T	C/T						C/T	C/T	delG+/-	
11B0106						C/T	C/T						C/T	C/T		
11B0109						C/T	C/T	delG+/-					C/T	C/T	delG+/-	
11B0117																

Tableau 11. Résultat du séquençage du gène NR5A1 à partir d'ADN de lymphocytes et de fibroblastes de prépuce.

VND : variation non décrite, ND : non déterminé, en gras : résultat discordant entre les types tissulaires.

Au total, pour NR5A1, huit polymorphismes et une seule variation non décrite 5 (c.1139-79G>A) située en amont du dernier exon ont été donc retrouvés.

d) Discussion

Séquençage du gène *NR5A1* chez 20 patients

Le séquençage de l'ADN lymphocytaire, des fibroblastes issus de tissu préputial et du tissu urétral n'a pas permis d'identifier de mutations du gène *NR5A1* chez 19 patients (1 échec). Cela peut s'expliquer par le faible effectif de notre cohorte et l'absence de sa stratification selon la sévérité de l'hypospadias. En effet, les mutations connues du gène *NR5A1* sont retrouvées chez 3/60 garçons présentant une forme péno-scrotale (Köhler et al., 2009).

Cependant, nous avons mis en évidence chez un patient une variation intronique non décrite du gène *NR5A1* en position c.1139-79G>A. Les conséquences potentielles sur l'épissage de ce polymorphisme non décrit, situé dans une région non codante, ont été étudiées.

L'apparition ou l'altération de sites consensus donneurs ou accepteurs d'épissage a été recherchée (analyse manuelle et à l'aide du programme MaxEntScan (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html)). L'altération potentielle d'un site de branchement a été évaluée à l'aide du programme Human Splicing Finder 2.4.1 (<http://www.umd.be/HSF/>).

Au total, cette variation non décrite ne présentait pas de caractère délétère intrinsèque évident.

Fréquence allélique supérieure de la variation c.437G>C

Les études d'association sont utilisées fréquemment en génétique pour rechercher des gènes candidats, comme le gène *DGKK* dans l'hypospadias (van der Zanden et al., 2011). La comparaison de la fréquence allélique du polymorphisme c.437G>C de l'exon 4 du gène *NR5A1* entre notre cohorte et les données de NCBI a permis de mettre en évidence une différence significative. En effet, la fréquence est inférieure dans la population étudiée (7,5% au lieu de 31,1%, $p = 0,007$). Ce polymorphisme entraîne le remplacement d'une Glycine, acide aminé hydrophobe par une Alanine, acide aminé également hydrophobe. Cette variation concerne la Glycine 146, résidu peu conservé au cours de l'évolution (une Alanine est retrouvée chez certains mammifères); elle ne semble pas susceptible d'altérer l'épissage. Nous pouvons émettre l'hypothèse que cette variation joue un rôle protecteur dans la survenue d'un hypospadias. L'étude comparative de la fréquence

allélique de cette variation par rapport à une population témoin doit être étendue à un effectif plus large.

Mise au point des extractions d'ADN tissulaire

Les techniques d'extraction d'ADN sanguin (N=20) et préputial (N=18) (à l'exception d'échec par contamination fongique du prélèvement initial) ont été qualitativement et quantitativement satisfaisantes. En revanche, l'extraction d'ADN à partir de frottis urétral n'a pas pu être possible en raison d'une concentration très faible et de mauvaise qualité.

4. Conclusion générale sur la recherche de mosaïques somatiques dans les gènes *AR*, *MAMLD1* et *NR5A1*

Notre hypothèse initiale, selon laquelle un évènement mutationnel pourrait survenir dans le tissu urogénital en reprenant la théorie du *double hit* de Knudson modifiée n'a pas été vérifiée. Elle semble pourtant intéressante puisque l'ADN du tissu préputial fait l'objet d'études qui mettent en évidence l'activité de certains gènes du développement (Kurokawa et al., 2011; Miyagawa et al., 2011). Notre étude n'a pas mis en évidence de variation flagrante entre la séquence germinale et somatique des gènes *AR*, *MAMLD1* et *NR5A1* chez les patients porteurs d'un hypospadias.

Pour le gène *AR*, la corrélation entre répétition de CAG et de GGN montre l'absence de corrélation dans 4 sur 22 cas (18,2%) totalement analysés pour le couple CAG/GGn et pour le couple germinale/somatique. De plus, trois polymorphismes fortement représentés dans notre cohorte pourraient être impliqués dans la physiopathologie de l'hypospadias. Il est encore prématuré d'interpréter ces résultats.

Pour le gène *MAMLD1* séquencé à partir de l'ADN lymphocytaire et fibroblastique de 20 patients, la concordance pour huit polymorphismes décrits est totale. Mais une discordance pour deux variations est également observée avec, d'une

part, l'absence de polymorphismes présents dans le sang pour deux évènements et, d'autre part, la présence chez un seul patient d'un polymorphisme au sein de l'ADN de fibroblastes préputiaux, entraînant le remplacement d'une Proline, acide aminé hydrophobe par une Sérine, acide aminé hydrophile. Cette variation, répertoriée dans NCBI et Ensembl, concerne la Proline 359, résidu conservé au cours de l'évolution et ne semble pas susceptible d'altérer l'épissage. Il est donc difficile de conclure sur un seul individu.

Enfin, l'étude comparative pour le gène *NR5A1* retrouve, d'une part, une perte d'hémizygotie pour la variation décrite c.437G>C pour un seul patient pouvant jouer un rôle protecteur et, d'autre part, la présence d'un polymorphisme décrit c.*172delG chez trois individus. Une étude concernant un effectif plus grand est nécessaire pour évaluer la pertinence scientifique de telles observations.

Le nombre de patient ayant pu bénéficier de l'ensemble des techniques prévues est trop faible pour réaliser une étude statistique. L'implication potentielle des variations recensées dans notre série nécessite des études fonctionnelles protéiques et de ségrégations familiales, souvent très longues et complexes à colliger.

B. Duplication intragénique dans le gène *NR5A1* et anomalie de la différenciation sexuelle

Le séquençage du gène *NR5A1* nous a permis de décrire un patient atteint de DSD 46,XY *SRY* positif, avec une duplication rare mais récurrente dans le gène *NR5A1*. Cette observation met en lumière un nouveau mécanisme d'altération du gène *NR5A1* différent des mutations habituellement rencontrées.

1. Patient

Le probant était un garçon de 15 ans qui présentait un micropénis avec une courbure sévère, un hypospadias proximal avec un méat périnéal et de petits testicules intrascrotaux de taille asymétrique. Il était né à terme par césarienne de parents non apparentés originaires du Tibet. Son poids de naissance était de 3700 g. Il avait un frère plus jeune en bonne santé et aucun antécédent de DSD n'a été identifié dans la famille. La mère avait 42 ans et ses règles étaient normales. Les concentrations sériques de la *Follicule-Stimulating Hormone* (FSH) et de la *Luteinizing Hormone* (LH) étaient normales.

Pendant son enfance, il avait subi de nombreuses chirurgies urogénitales au Tibet jusqu'à l'âge de 4 ans, tout d'abord pour la chirurgie initiale puis pour une sténose et une fistule de l'urètre. Le caryotype initial était 46, XY. À l'âge d'un an, un test de stimulation à l'aide d'hormone chorionique gonadotrophique (hCG) a été effectué (1500 UI injectées par voie sous-cutanée toutes les 48 heures, 3 fois) et était normal. Le niveau de testostérone a augmenté après les injections de hCG et le rapport testostérone sur dihydrotestostérone après 24 et 72 heures de test de stimulation par hCG était normal (Tableau 12, A).

A			
	Testosterone levels (ng/dL)	DHT levels (ng/dL)	T/DHT
D1	217	130	1.66
D2	568		
D3	990	290	3.4

B		
	Baseline	Peak
LH	14 UI/L (0.3-5.2)	132 UI/L (13-62)
FSH	14 UI/L (1.7-10)	34 UI/L (3.3-22)

C	
Testosterone	438 ng/dL (243-832)
DHT	74 ng/dL (33-120)
AMH	28 pmol/L (20-586)

Tableau 12. Bilans hormonaux.

A: Results of hormonal screening performed at one year old. hCG stimulation test (administration of 1500 UI x3 of hCG). D1, D2, D3: days after stimulation.

B: Results of GnRH test performed at the age of 14 years and 6 months. Levels of LH (Luteinizing hormone) and FSH (follicle-stimulating hormone) were determined before (baseline) and after intravenous injection of 100 µg of GnRH (peak).

C: Hormonal levels at the age of 14 years and 6 months.

À la même période, il avait reçu trois injections de testostérone (25 mg) avec une réponse modérée sur la longueur du pénis. Depuis son arrivée en France à l'âge de 11 ans, il présente des fonctions psychomotrices normales. À l'âge de 13 ans, il a eu une nouvelle intervention chirurgicale pour traiter son hypospadias et corriger la courbure du pénis. La courbure initiale du pénis avant cette nouvelle intervention était d'environ 90 degrés. La reconstruction urétrale a été réalisée à l'aide d'une greffe de muqueuse buccale et d'un greffon cutané. À l'âge de 14 ans et 4 mois, une échographie pelvienne a montré l'existence d'une structure compatible avec une cavité müllérienne, confirmée par une imagerie par résonance magnétique du pelvis montrant que cette cavité se terminait dans la partie distale de l'urètre postérieur et avait probablement augmenté de taille avec la sténose.

A 14 ans, le pénis était mesuré à 5 cm sans aucune courbure, mais le méat était toujours périnéal. Il est entré spontanément en puberté, mais les testicules étaient décrits petits et asymétriques (6 mL à droite, 4 mL contre 15 mL attendus chez un garçon pubère de son âge). Il souffrait également de troubles mictionnels liés à une sténose persistante du méat urétral nécessitant une dilatation quotidienne de l'urètre

par auto-cathétérisme. Un test à la *Gonadotrophin-releasing hormone* (GnRH) a été réalisé avec une injection intraveineuse de 100 µg de GnRH et a montré des taux élevés de gonadotrophines compatibles avec une dysgénésie testiculaire (Tableau 12, B). Les taux de testostérone, de dihydrotestostérone (DHT) et d'hormone anti-Müllérienne (AMH) étaient normaux (Tableau 12, C). Aucune protéinurie n'a été remarquée.

L'examen physique à l'âge de 15 ans a montré une longueur de pénis de 6 cm. Le volume des testicules a diminué à 2 mL pour le testicule droit et à 4 mL pour le testicule gauche. Il devait toujours s'auto-cathétériser deux fois par jour.

La coagulation sous endoscopie de la cavité mullérienne a été réalisée à l'âge de 15 ans et 7 mois afin d'éviter l'apparition d'infections urinaires. Sa dernière évaluation à 15 ans et 9 mois ne montrait aucune récurrence infectieuse ni de recours au cathétérisme intermittent. Il décrivait des érections normales sans notion d'éjaculation. L'évaluation de la fonction surrénalienne était normale (cortisol : 90 ng/mL, ACTH : 24,8 pg/mL). La fonction leydigienne était toujours préservée avec un taux de testostérone de 4,4 ng/mL, mais la fonction sertolienne était altérée avec un taux d'inhibine B inférieur aux valeurs normales (57 pg/mL *versus* normes entre 100 et 390 pg/mL).

2. Méthodes

Un échantillon sanguin pour une analyse génétique a été prélevé après consentement écrit obtenu auprès de ses parents. Le caryotype et l'analyse en FISH ont été réalisés à l'aide de techniques conventionnelles. L'ADN génomique a été extrait en utilisant la méthode d'extraction Flexigene (Qiagen, Hilden, Allemagne). Les régions codantes et les régions flanquantes introniques du gène *NR5A1* ont été amplifiées et séquencées. Le séquençage selon la technique de Sanger a été réalisé à l'aide du kit de séquençage de cycle BigDye Terminator v3.1 à prisme ABI (Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA) sur un séquenceur automatique (Applied Biosystem

3730XL). L'étude a été approuvée par le comité éthique de l'Hôpital d'Enfants Armand Trousseau (AP-HP).

3. Résultats

Les explorations endocriniennes sont résumées dans le Tableau 12 et ont montré la préservation de la fonction leydigienne, une altération de la fonction sertolienne et des taux élevés de gonadotrophines compatibles avec une dysgénésie testiculaire.

Les études chromosomiques ont confirmé un caryotype 46, XY normal, avec le gène *SRY* présent après analyse en FISH. Le séquençage selon la technique de Sanger du gène *NR5A1* (NM_004959) a révélé une duplication hétérozygote en cadre d'un motif CTGCAGCTG de neuf paires de bases (pb) [c.691_699dupCTGCAGCTG (p.Leu231_Leu233dup)] situé au niveau de l'exon 4 dans une région répétée (CTGCAGCTG) d'un troisième motif Leu-Gln-Leu (LQL) dans la protéine (Figure 26-A). Cette duplication est située à la partie N-terminale de la région LBD (Ligand Binding Domain) (Figure 26-B) de la protéine SF-1 dans une partie hautement conservée (Figure 26-C). Les ADN paternel et maternel ont également été analysés et n'ont montré aucune duplication, prouvant ainsi le caractère *de novo* cette duplication.

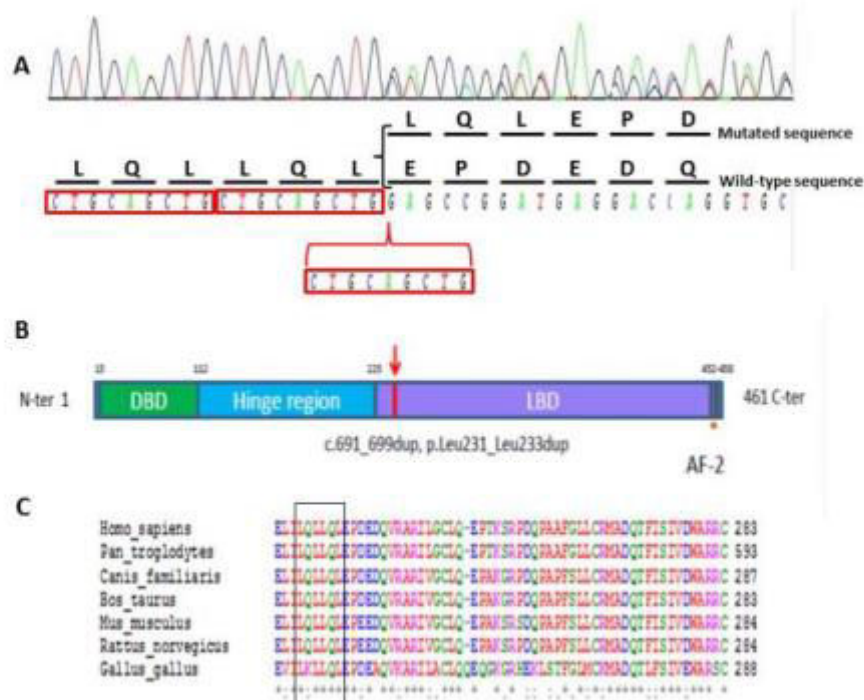


Figure 26. Représentation schématique du gène *NR5A1*, de la séquence d'acide aminée spécifique et de sa variation inter-espèce.

(A) Sanger sequencing of genomic DNA revealed a heterozygous duplication of 9 bp in exon 4 of the *NR5A1* gene [c.691_699dup (p.Leu231_Leu233dup)] (red frame) immediately downstream of a duplicated sequence (black frame).

This duplication leads to the insertion of a third LQL amino acid motif.

(B) Diagram of SF-1 Wild type amino acid sequence with position of the mutation indicated by a red arrow.

Numbers above the diagram indicate the position of the amino acid at the start of the domain or those contained in the domain for AF-2. N- Ter, N terminal; C- Ter, C terminal; AF-2, activation function domain 2; DBD, DNA binding domain; LBD, Ligand binding domain (inspired from a figure from (Camats et al., 2012).

(C) Comparison of SF-1 protein sequences in the region of the mutation from different species. It indicates that this region is highly conserved (in the black square LQL amino acid pattern conserved, position 231 to 233).

4. Discussion

La duplication hétérozygote [c.691_699dup (p.Leu231_Leu233dup)] dans l'exon 4 du gène *NR5A1* n'est pas encore répertoriée dans les bases de données de polymorphismes ExAC et EVS (<http://exac.broadinstitute.org/> et <http://evs.gs.washington.edu/EVS>). Le fait qu'elle ait déjà été décrite à deux reprises, *de novo* et à l'état hétérozygote, chez des patients présentant des anomalies génitales

graves suggère qu'elle est récurrente chez l'Homme, bien que rarement observée, et qu'elle soit responsable du phénotype commun à tous ces patients (Camats et al., 2012; Pedace et al., 2014).

En effet, des études fonctionnelles et d'expression de cette duplication ont déjà été réalisées en 2012 (Camats et al., 2012). Elles ont montré que la protéine mutante était exprimée et que l'activité du promoteur CYP17A1 (l'une des cibles de SF-1) était altérée dans les cellules NIC-H295R et HEK293 transfectées avec un plasmide exprimant la protéine mutante. Comme la duplication avait été trouvée à l'état hétérozygote, la protéine de type sauvage a été co-exprimée avec celle mutée dans les cellules HEK293 afin de tester un effet négatif dominant potentiel de la protéine mutée sur celle de type sauvage. L'activité du promoteur CYP17A1 demeurant inchangée dans ces conditions expérimentales, il est probable qu'une haploinsuffisance soit la cause du phénotype chez les porteurs de la duplication. Cette hypothèse est renforcée par la description de la suppression de trois acides aminés à la même position dans la protéine SF-1 (p.Leu231_Leu233del) chez une patiente 46,XX présentant une insuffisance ovarienne primaire et une petite taille (Lourenço et al., 2009). Les délétions et les duplications apparaissent dans la même région du gène (c.691_699) dans une région répétée (CTGCAGCTG) x2, suggérant ainsi que cette région pourrait être un « *hot spot* » pour des recombinaisons homologues non alléliques ou pour des erreurs de réplication connues sous le nom de « *slipped strand mispairing* » (SSM) résultant d'un défaut d'appariement de bases complémentaires (Ball et al., 2005; Chen et al., 2012).

En conclusion, cette duplication intragénique hétérozygote au sein de la zone répétée (CTGCAGCTG) × 2 du gène *NR5A1* a été découverte chez un patient 46,XY DSD âgé de 15 ans, présentant une micropénis et un hypospadias proximal. Le caractère récurrent, bien que rare, des anomalies (duplications ou délétions) de cette région du gène *NR5A1* suggère qu'elle joue un rôle important dans la fonction gonadique de la protéine SF-1 et qu'elle constitue un « *hot spot* » pour les réarrangements intragéniques.

Cette observation a fait l'objet d'une publication dans la revue *Sexual Development*.

C. Recherche de microremaniements chromosomiques par l'étude systématique de cas de DSD et d'hypospadias en puce ADN de type SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*).

Afin d'identifier des remaniements chromosomiques et de nouveaux gènes candidats responsables de la survenue d'un hypospadias, les patients suivis en urologie pédiatrique à l'AP-HP ont eu une étude par caryotype conventionnel et une étude par puce à ADN au sein du laboratoire de génétique et embryologie médicale de l'Hôpital d'Enfants Armand Trousseau.

1. Patients

Entre novembre 2010 et août 2018, 284 patients ont été inclus dans cette étude, répartis de la façon suivante : 61 hypospadias proximaux et 223 hypospadias distaux isolés sans caractère familial à l'interrogatoire. Les données démographiques, cliniques et opératoires sont regroupées dans le Tableau 13.

	Total N=223	Pas d'anomalies en puce N = 188	Anomalies en puces N = 35	<i>p-value</i>
PMA	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,99
Prééclampsie	18 (8,1%)	15 (6,7 %)	3 (8,8 %)	0,14
Terme (SA)	38,6 +/- 2	38,5 +/- 2	38,9 +/- 2	0,28
Poids de naissance (g)	2937 +/- 892	2933 +/- 900	2959 +/- 847	0,87
Age maternel (an)	32,6 +/- 8	32,5 +/- 9	32,9 +/- 4	0,80
Age paternel (an)	35,8 +/- 6	35,9 +/- 6	36,2 +/- 7	0,79
Traitement maternel	28 (12,6%)	25 (11,2 %)	3 (8,8 %)	0,44
Acide folique (%)	177 (79,4%)	153 (67,8 %)	24 (70,6 %)	0,11
Cryptorchidie unilatérale palpable	25 (11,2%)	20 (8,9 %)	5 (14,7 %)	0,60

Tableau 13. Caractéristiques de la cohorte des patients atteints d'un hypospadias distal.
g, gramme ; N, nombre ; PMA, procréation médicalement assistée ; SA, semaine d'aménorrhée.

2. Matériel et méthodes

a) Analyse cytogénétique conventionnelle

Un caryotype standard en bandes R et en bandes G sur lymphocytes sanguins en métaphase a été réalisé en première intention selon les recommandations de l'A.C.L.F. Les chromosomes ont été classés selon la nomenclature internationale de l'ISCN (*An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*), en fonction de leur taille, de leur indice centromérique et de leur morphologie (composition en bandes). Le but était d'identifier d'importants réarrangements déséquilibrés tels que des délétions et des duplications ou des réarrangements équilibrés tels que les translocations.

b) Puce à ADN de type SNP

L'ADN génomique a été extrait pour chaque patient à partir de 5 mL de lymphocytes sanguins à l'aide du kit FlexiGene DNA (Qiagen, Valencia, CA, USA) conformément aux instructions du fabricant. La concentration et la qualité de l'ADN était analysées par spectrophotométrie.

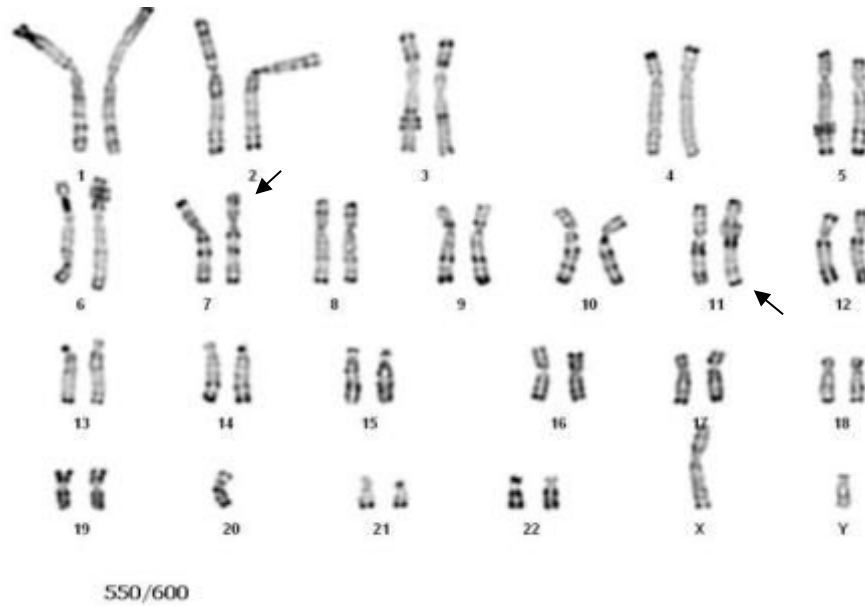
L'étude pangénomique par puce à ADN à la recherche de microremaniements chromosomiques susceptibles d'expliquer les phénotypes observés et/ou d'orienter la recherche vers de nouveaux loci ou gènes candidats a été réalisée pour tous les patients. La puce utilisée était la puce HumanCytoSNP-12 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), techniquée au sein du Plateau technique mutualisé de Génétique constitutionnelle du GHU Est (Coordinateur Pr. J.-P. Siffroi).

L'analyse des données a été réalisée avec le logiciel GenomeStudio et les résultats étaient interprétés avec l'U.C.S.C. Genome Browser. Les variations du nombre de copies recensées ont été comparées à la base de données de CNV : *Database of Genomic Variants* (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

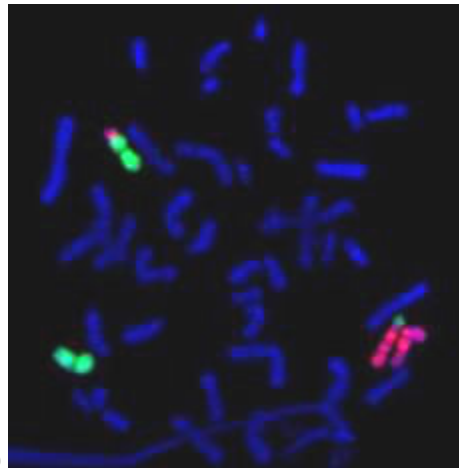
3. Résultats

a) Caryotype

L'analyse cytogénétique initiale des 223 échantillons n'a montré aucune anomalie détectable à ce niveau de résolution sauf un seul réarrangement chromosomique consistant en une translocation apparemment équilibrée entre un chromosome 7 et un chromosome 11. Étant donné que les caryotypes parentaux étaient normaux, cette translocation a été considérée comme survenue *de novo*. Par conséquent, le caryotype du patient était 46, XY, t (7; 11) (p14; q23)dn (Figure 27, A). Cette translocation réciproque a été confirmée en FISH avec les sondes de peinture des chromosomes 7 et 11 (Figure 27, B).



A)



B)

Figure 27. Translocation 46,XY,t(7;11)(p14;q23).

A : Caryotype en bande R du patient 11B2285 : 46,XY, t(7 ; 11)(p14 ; q23) (flèche).

B : Hybridation *in situ* en fluorescence avec les sondes de peinture des chromosomes 7 (rouge) et 11 (verte).

b) Analyse en SNP-Array

Parmi les 223 ADN génomiques analysés, 662 CNVs ont été trouvés, ce qui donne une moyenne d'environ 3 CNV par patient (Figure 28).

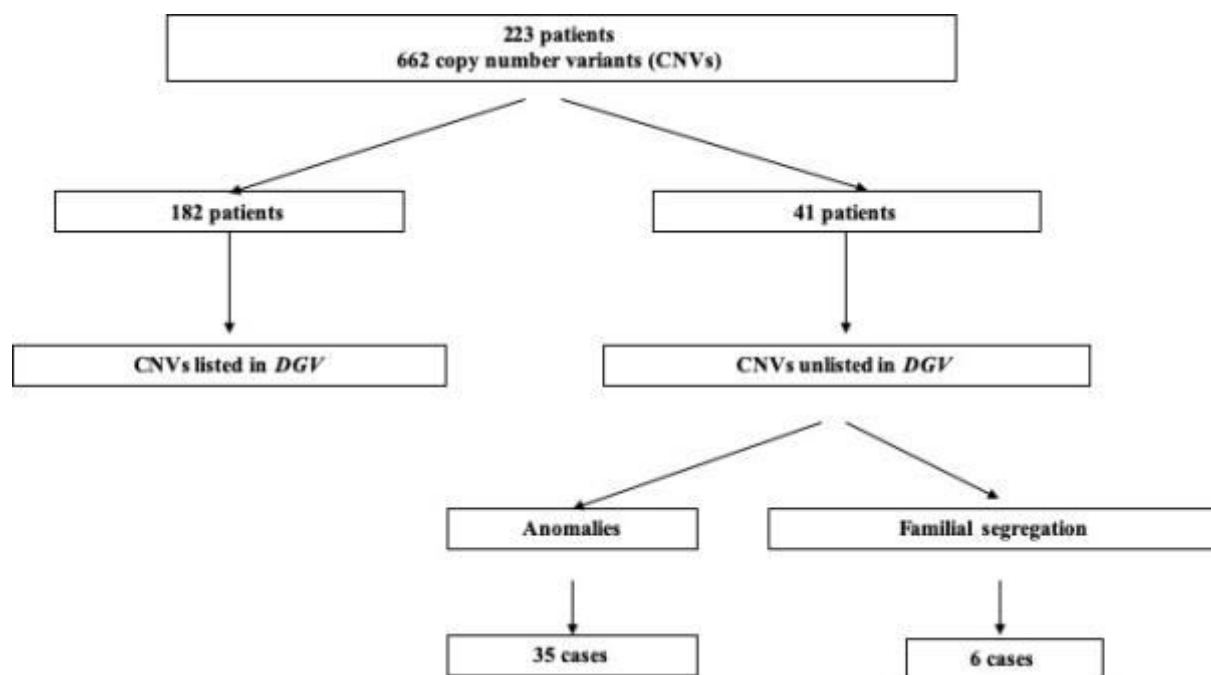


Figure 28. Flow chart de la cohorte de 223 patients atteints d'un hypospadias distal.

Pour 182 patients, 546 CNVs ont été considérés comme des polymorphismes du nombre de copies, tels qu'ils ont été rapportés dans la base de données des variants génomiques de Toronto (DGV) (Iafrate et al., 2004). Cette base de données répertorie les CNVs détectés chez des individus en bonne santé et a été considérée comme une population témoin pour plusieurs études. Pour les 41 patients restants, 123 CNVs ont été identifiés comme nouveaux c'est-à-dire non déclarés auparavant. Une étude familiale a révélé une hérédité parentale dans six cas.

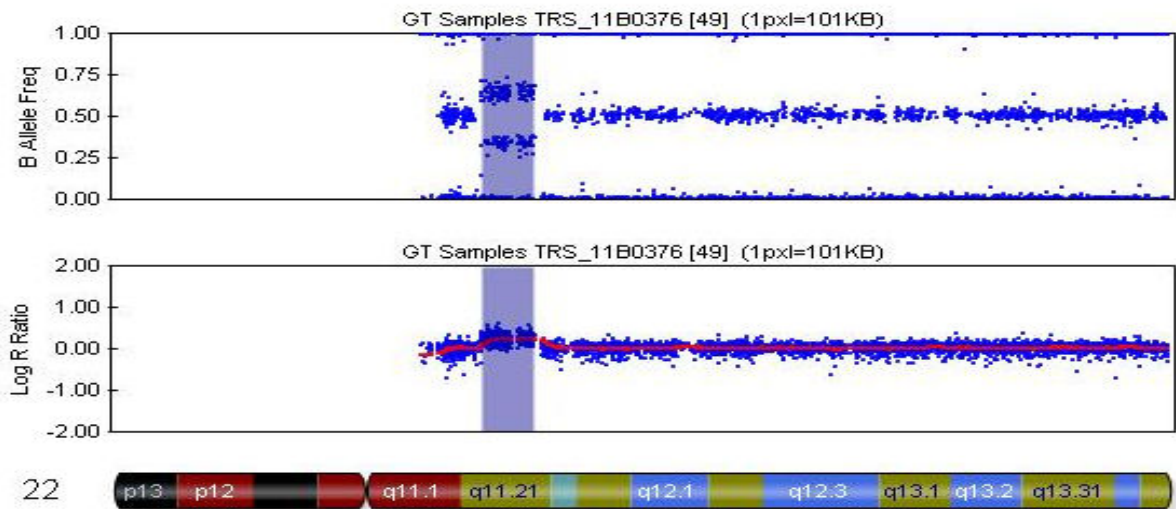
L'analyse pangénomique a donc au final identifié 35 (15,7%) anomalies pouvant être une cause potentielle d'hypospadias dans cette cohorte d'enfants atteints d'hypospadias distal isolé non héréditaire. La Figure 29 donne un panel schématique des anomalies identifiées. Le Tableau 14 et le Tableau 15 résument les réarrangements chromosomiques détectés chez les 30 patients susceptibles d'être impliqués dans cette pathologie et chez cinq patients dont l'analyse par puce à ADN SNP a retrouvé des régions communes d'homozygotie > 2 Mb (Figure 30). Au total, ces anomalies regroupent : 17 duplications, six duplications doubles, trois délétions, deux délétions avec duplications, une translocation avec une duplication et une translocation visible seulement au caryotype conventionnel regroupant au total 25 gènes candidats impliqués dans la différenciation testiculaire, la synthèse des androgènes, le développement de la glande pinéale ou des facteurs de transcription (Tableau 16).

Patients	Anomalies	Résultats puce SNP	Gènes
1	Duplication	Dup 3q26.32 (440 kb)	<i>TBL1XR1</i>
2	Duplication	Arr 7q22.1	<i>CUX1</i>
3	Duplication	Dup 14q32 (516 kb)	<i>OBR1</i>
4	Duplication	Dup 30 kb	
5	Duplication	Dup 3p12.3 (1 Mb)	<i>MIR4444</i>
6	Duplication	Dup Xq	
7	Duplication	Fragilité bras long Ch12	
8	Duplication	Fragilité bras long Ch12	
9	Duplication	Région pseudoautosomale chr X et Y	<i>ASMT, DHSRX</i>
10	Duplication	Dup22q11.2 (2,6 Mb)	<i>TBX1</i>
11	Duplication	Dup 20p12.2	
12	Duplication		
13	Duplication	Dup 1p33 (34 kb)	<i>CYP4B1</i>
14	Duplication	Arr Xq26.3(134,487,570-134,662,861)x3 170 kb	
15	Duplication	Dup 6q13 (622 kb)	<i>OGFRL1 MIR30C2 MIR30A LINC00472</i>
16	Duplication	Dup 6q13 (622 kb)	<i>OGFRL1 MIR30C2 MIR30A LINC00472</i>
17	Duplication	Dup 21q11.2 (50 kb)	<i>ABCC13</i>
18	Double duplication	Dup 15q13.3 (1.5 Mb) + dup 21q11 ;2 (30 kb)	<i>CHRNA7 ABCC13</i>
19	Double duplication	Dup 16q24.3 + 20p12.1	<i>FANCA</i>
20	Double duplication	Dup 12q + 22q	<i>DPY19L2</i>
21	Double duplication	Nombreuses duplications	
22	Double duplication	Dup 7q11.21 (30 kb) + 11p13 (407 kb)	<i>KCTD7, TCP11L1, CSTF3, HIPK3</i>
23	Double duplication	Dup 12p (1 Mb) + dup 17q	<i>CACNA1C, KANSL1</i>
24	Deletion	Deletion 5q32.2 (167 kb)	
25	Deletion	Deletion 12q14.3	<i>TMBIM4, IRAK3</i>
26	Deletion	Del 6p12.1(500 kb)	
27	Del/dup	Dup 12q14.2 (173,5 kb) + deletion xq28 (527 kb)	<i>DPY19L2, MAMLD1</i>
28	Del/dup	Del 1q21.1 (1,38 Mb) + dup chr 12 (38 kb)	
29	Trans/dup	t(7,11) + dup Xp22.31 (130 kb)	<i>KAL1</i>
30	Translocation	46,XY,t(7,11)(p14,q23)	

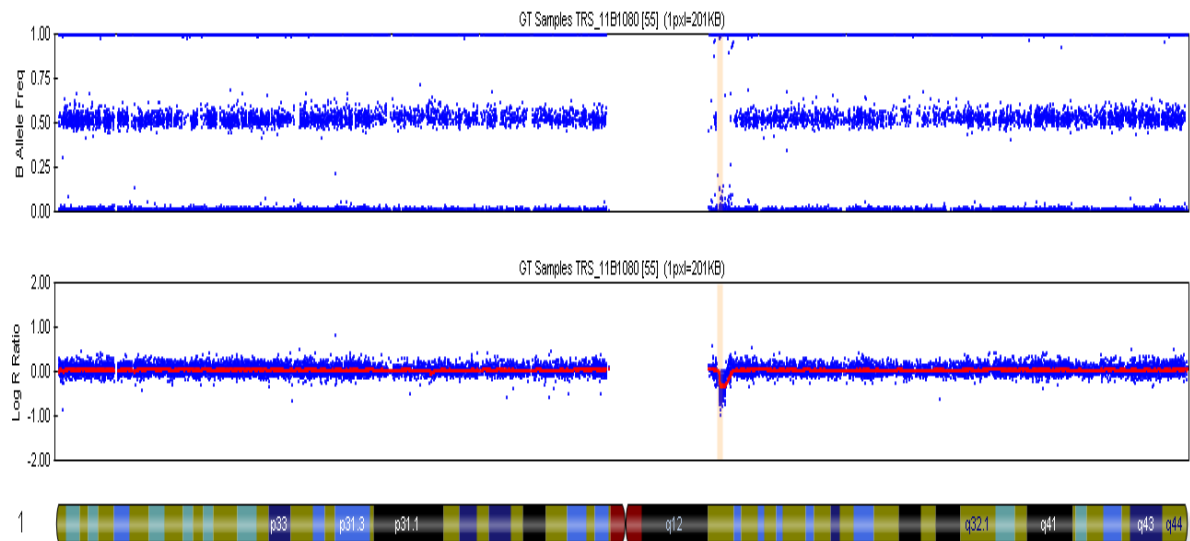
Tableau 14. Tableau récapitulatif des CNVs répertoriées dans les 30 cas d'hypospadias avec anomalies en puce.

Anomalies	N	Taille (kb)
Translocation <i>de novo</i> (caryotype)	1	
Duplication	17	30 - 3000
Double duplication	6	
Délétion	3	167 – 1500
Délétion et duplication	2	38 – 1400
Translocation et duplication	1	130

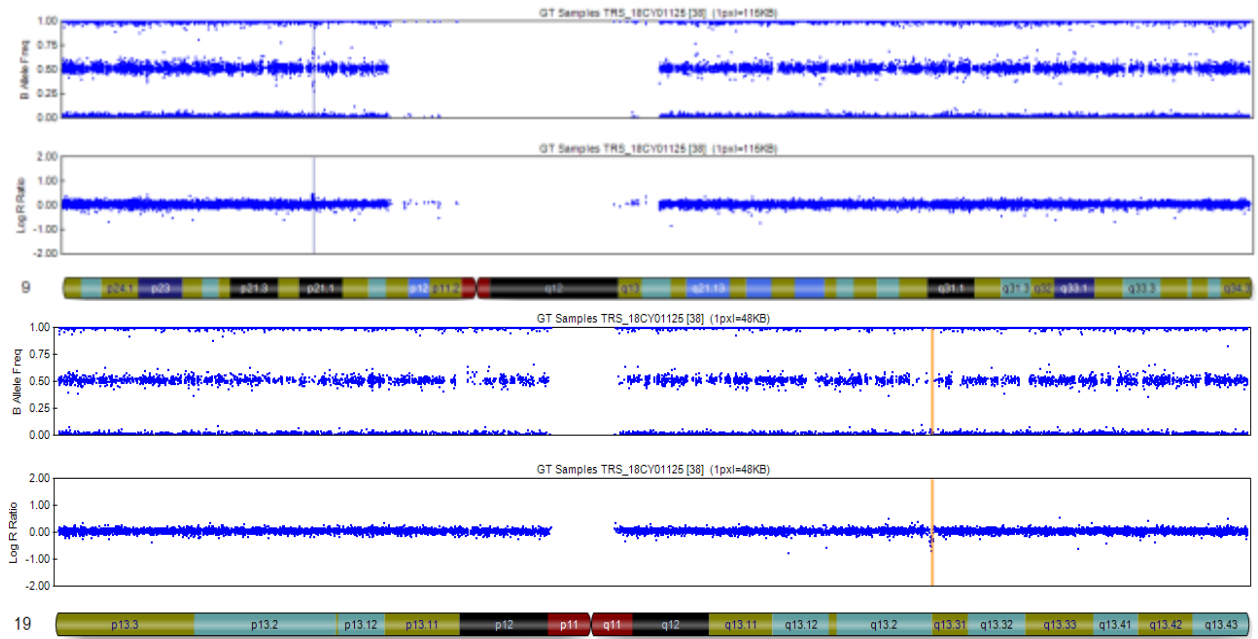
Tableau 15. Résumé des réarrangements chromosomiques détectés par puce à ADN de type SNP chez 30 patients.



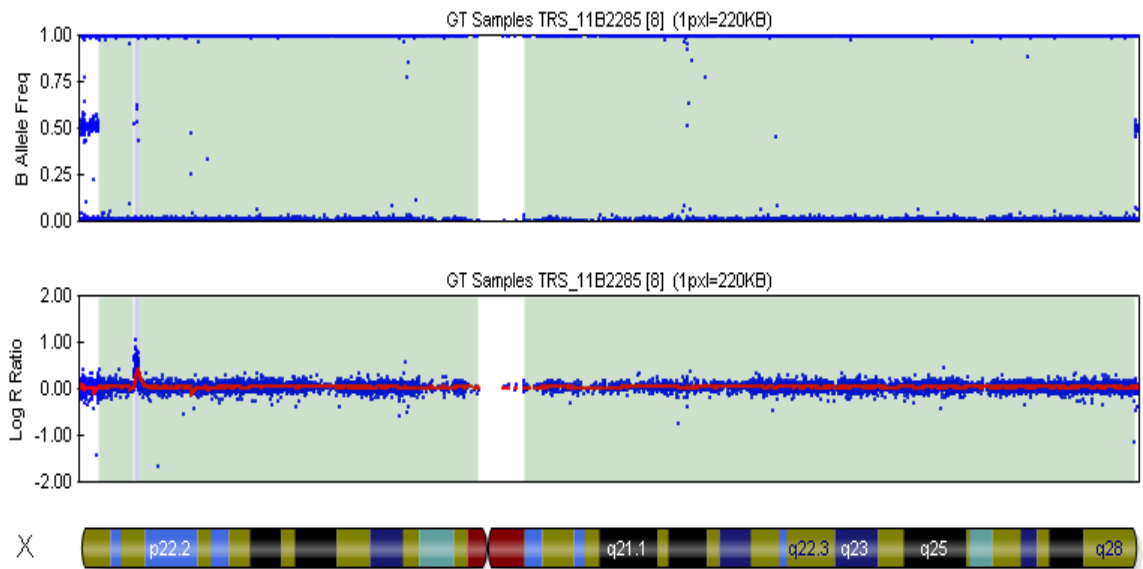
A)



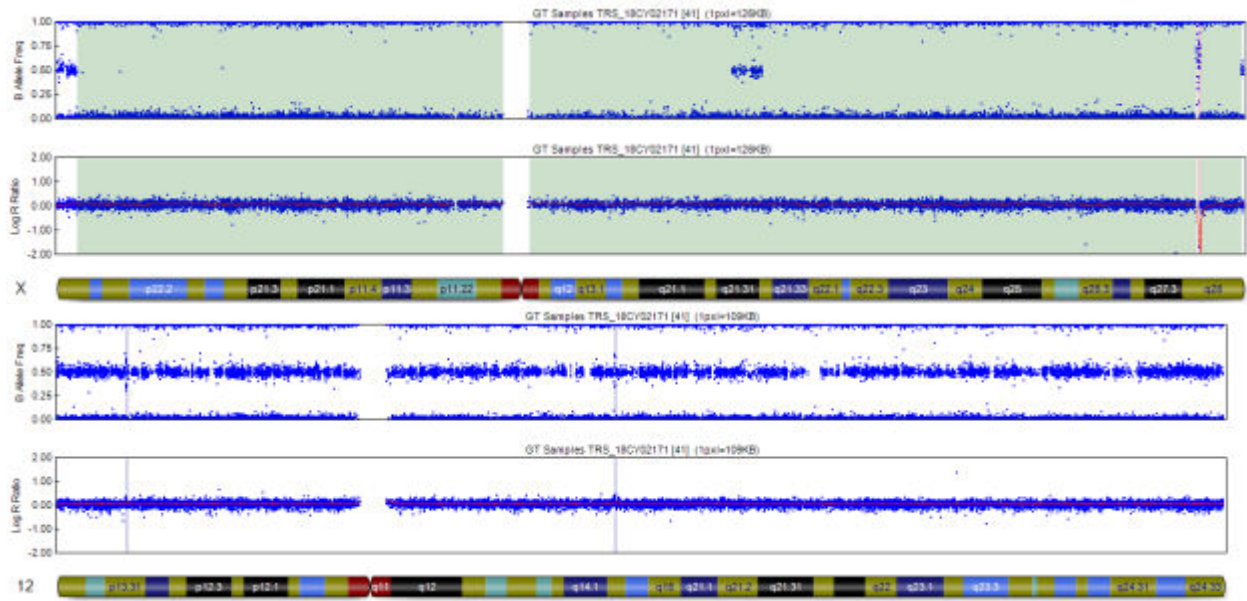
B)



C)



D)



E)

Figure 29. Exemples d'anomalies pangénomique.

- A) Exemple de duplication (dup22q11.2) (2.6 Mb).
- B) Exemple de délétion (del1q21.1) (1.4 Mb).
- C) Exemple de double duplication (dup12q & 22q) (173 & 121 kb).
- D) Exemple de trans/dup 46,XY,t(7,11)(p14,q23) & dupXp22.31 (130 kb)
- E) Exemple de del/dup (delXq28) & (dup12q14.2) (527 & 173 kb)

Gène	Chr.	Gène OMIM	Phénotype OMIM	Anomalie connue pour l'hypospadias
Transcription de l'ARNm				
<i>CSTF3</i>	11	600367	Polyadénylation pré-ARNm au niveau du testicule	
<i>DDX56</i>	7	608023	Embryogenèse, spermatogenèse	
<i>MIR30A</i>	6	612329	Régulation post-transcriptionnelle	
<i>MIR30C2</i>	6		Régulation post-transcriptionnelle	
<i>MIR4444</i>	2		Régulation post-transcriptionnelle	
Différenciation testiculaire				
<i>CUX1</i>	7	618330	Retard mental – spermatogenèse	
<i>DHSRX</i>	X			
<i>DPY19L2</i>	12	613958	Spermatogenèse	
<i>KANSL1</i>	17	610443	Retard mental, malformations génito-urinaires	
Synthèse des androgènes				
<i>CYP4B1</i>	1		Synthèse des stéroïdes via le cytochrome P450	
<i>HIPK3</i>	11	604424	Régulation de l'expression de SF-1	
<i>MAMLD1</i>	X	300758	Hypospadias	Délétion
Développement hypophysaire				
<i>ASMT</i>	X	300015	Rôle dans la glande pinéale	
<i>KAL1</i>	X	308700	Syndrome de Kallmann (hypogonadisme central)	Délétion
Facteurs de transcription				
<i>TBL1XR1</i> (WNT)	3	616944	Retard mental (altération de la voie de WNT)	
<i>TBX1</i> (testis)	22	188400	Séquence de DiGeorge	Délétion
Autres				
<i>ABCC13</i>	21			
<i>CACNA1C</i>	12			
<i>CHRNA7</i>	15			
<i>KCTD7</i>	7			
<i>LINC00472</i>	6			
<i>OBR1</i>	5			
<i>OGFRL1</i>	6			
<i>TCP11L1</i>	11			
<i>TMBIM4</i>	12			

Tableau 16. Gènes candidats (N=25) potentiellement impliqués dans la physiopathologie des hypospadias distaux isolés découverts par puces à ADN de type SNP.

Seuls les 16 premiers ont un rapport direct avec l'hypospadias.

Ainsi, dans cette cohorte d'hypospadias distaux isolés, l'étude de ségrégation familiale a mis en évidence un caractère héréditaire dans six cas. Au final, trente-cinq anomalies (15,7%) pouvant être en lien avec la survenue d'un hypospadias distal isolé ont été identifiées par puces à ADN. Une seule translocation 46,XY,t(7;11)(p14;q23) *de novo* a été visible sur le caryotype. Des variations du nombre de copies susceptibles d'être impliquées dans cette pathologie étaient présentes chez 30 patients : 17 duplications, six délétions, trois double-duplications, une translocation avec duplication, deux délétion / duplication, qui englobent un total de 25 gènes candidats dont 16 impliqués dans la physiopathologie de l'hypospadias.

c) Etude des régions d'homozygotie (ROH)

L'étude pangénomique par puce à ADN SNP a retrouvé des régions communes d'homozygotie > 2 Mb chez cinq patients, qui pourraient abriter des gènes candidats porteurs de mutations homozygotes. La Figure 30 affiche les différentes valeurs pour chaque patient.

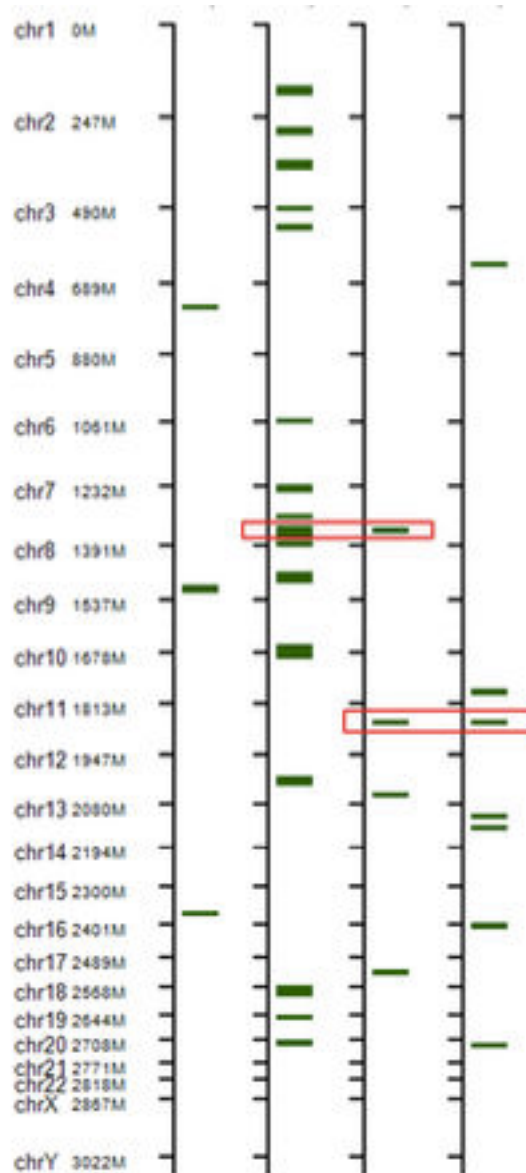


Figure 30. Détection par puce à ADN de type SNP-array de régions communes d'homozygotie > 2 Mb chez quatre des cinq patients qui pourraient contenir des mutations homozygotes dans des gènes candidats.

d) Discussion

Les investigations génétiques sur les malformations congénitales sont désormais plus courantes grâce aux nouvelles technologies telles que les puces à ADN. L'utilisation de la puce HumanCytoSNP-12 BeadChip est un outil puissant pour étudier les malformations congénitales isolées. Cette micropuce a une haute résolution qui permet d'identifier de petits réarrangements aussi petits que 20 kb, non visibles sur un caryotype standard. En effet, en supposant que la malformation isolée puisse être due à la perte ou à la duplication d'un gène donné, isoler une région chromosomique aussi courte que quelques kilobases peut aider à déterminer de nouveaux gènes candidats responsables de diverses maladies génétiques. L'autre avantage majeur de l'utilisation des puces SNP est sa capacité à révéler des aberrations chromosomiques neutres en nombre de copies, telles que des LOH ou des UPD (*Uniparental Disomy*), qui ne sont pas détectables par la technique classique de CGH (*Comparative Genomic Hybridization*). De plus, la CGH-array, qu'elle utilise des puces classiques ou de type SNP, est incapable d'identifier des réarrangements chromosomiques équilibrés, ce qui rend encore nécessaire l'établissement d'un caryotype.

L'analyse en puce SNP a permis d'identifier des LOH. Il est possible de détecter une LOH inférieure à 2 Mb chez les patients témoins, en particulier lorsque les SNP ne sont pas très polymorphes dans la population générale. Cependant, lorsque la LOH est supérieure à 2 Mb et répartie dans le génome, ils indiquent une consanguinité probable. Dans notre étude, la consanguinité était suspectée chez six patients car leurs parents étaient de la même origine et du même village mais ils n'étaient pas au courant de leur lien de parenté possible. Chez deux patients, il y avait des antécédents de consanguinité au troisième degré ou plus et, dans un cas, les parents étaient des cousins. Pour les autres patients, les parents n'ont pas signalé de lien de parenté. Comme le montre la Figure 30, toutes les régions LOH étaient différentes d'un patient à l'autre, à l'exception de deux d'entre elles situées respectivement sur les chromosomes 11 et 7 partagées par deux patients. Cependant, sur le chromosome 11, cette LOH est souvent retrouvée en pratique courante et n'a jamais été associée à des hypospadias. La LOH sur le chromosome 7 reste encore à évaluer avec plus de précision.

L'étude de la LOH est un moyen efficace d'identifier de nouveaux gènes putatifs impliqués dans la pathologie. Cependant, ici, les LOH sont de taille importante et l'identification d'un gène récessif parmi les milliers trouvés dans la région LOH pour chaque patient demandera beaucoup de temps. Deux de nos patients avaient un frère indemne et il pourrait être intéressant de comparer la région LOH identifiée chez notre patient à celle des frères. Cependant, ils sont encore jeunes et leurs échantillons ne sont pas disponibles. L'utilisation de nouvelles technologies comme le séquençage à haut débit (NGS) pourrait constituer une méthode intéressante pour explorer ces résultats.

Par ailleurs, l'analyse pangénomique a révélé que 15,7% de CNVs pouvaient être liées à la survenue d'un 'hypospadias. Cette étude soulève la question épineuse des difficultés lors des conseils génétiques chez les patients atteints d'hypospadias isolés porteurs d'anomalies génétiques à expressivité incomplète et / ou variable.

Une étude intéressante de Singh et al. s'est concentrée sur les CNVs en fonction de la sévérité de l'hypospadias (Singh et al., 2018). La plus importante étude réalisée au Danemark a montré que l'association de 18 régions génomiques était associée à l'hypospadias. Cette étude a été réalisée sur 1006 cas d'hypospadias confirmés par chirurgie et sur 5486 contrôles danois. La validation de 1972 et 1812 contrôles au Danemark, aux Pays-Bas et en Suède ont montré une association indépendante de 18 régions génomiques ($p < 5.10^{-8}$) avec le développement d'hypospadias. Les régions identifiées comprenaient des gènes jouant un rôle clé dans le développement embryonnaire (notamment les clusters *HOXA* (*HOXA4* et *HOXA13*), *IRX5*, *IRX6* et *EYA1*) (Geller et al., 2014). Carmichael et al. ont également examiné l'association de variants dans des gènes liés à la biosynthèse et au métabolisme des hormones sexuelles dans 633 cas d'hypospadias de sévérité variable (84 distaux, 322 moyens, 212 de classification indéterminée) et 855 cas issus d'une population témoin mâle non malformé né en Californie de 1990 à 2003 (Carmichael et al., 2014). Ils ont retrouvé 332 polymorphismes relativement communs de marqueurs simples (tagSNPs) dans 20 gènes. Parmi ces 332 polymorphismes, plusieurs SNP significatifs ont été identifiés : un dans le *CYP3A4*, quatre dans le *HSD17B3*, un dans le *HSD3B1*, deux dans le

STARD3, 10 dans le *SRD5A2* et sept dans le gène *STS*, ce qui a montré une association avec le risque d'hypospadias. Tous ces gènes contribuent à la biosynthèse et au métabolisme des hormones sexuelles.

e) Limites

La principale limite de cette étude réside dans le fait que l'étude en SNP est relativement nouvelle et que, à l'heure actuelle, il existe peu d'études sur l'hypospadias. Plusieurs patients avec des CNV identiques ou similaires devront montrer que le CNV a provoqué l'hypospadias. De plus, les bases de données sur la CNV ne signalent pas systématiquement si la personne testée était un homme ou une femme, ce qui rend l'étude des caractères dépendants du sexe plus difficile lorsqu'on étudie des patients atteints d'hypospadias. Enfin, l'étude pangénomique ne teste pas les translocations chromosomiques ni les mutations ponctuelles et ne constitue donc pas un test totalement suffisant pour dépister toutes les variants génétiques. Par ailleurs, nous n'avons pas effectué de tests fonctionnels pour démontrer que les CNVs pouvaient être responsables du phénotype clinique.

En conclusion, l'analyse pangénomique par puces à ADN a trouvé de façon surprenante 15,7% d'anomalies susceptibles d'être en lien avec la survenue d'un hypospadias distal isolé non héréditaire. Ceci est à un niveau attendu par rapport aux études précédentes sur la détection de CNVs dans les hypospadias isolés et constitue une contribution précieuse à l'arsenal diagnostique de ces patients pour lesquels aucun d'entre eux ne reçoit aujourd'hui de diagnostic moléculaire.

L'utilisation de ces nouveaux outils d'analyse génétique semble essentielle à la compréhension des mécanismes de survenue de cette pathologie malgré un conseil génétique potentiellement difficile.

Cette étude met ainsi en évidence l'utilité des puces SNP dans les malformations potentiellement génétiques et soulève la question des difficultés de conseil génétique. Même si aucun gène candidat évident pour l'hypospadias n'a pu

être formellement identifié, il est frappant de constater que de nombreux gènes impliqués dans la différenciation des organes génitaux masculins sont impliqués dans ces réarrangements. L'utilisation du séquençage de nouvelle génération (NGS) pourrait être une méthode attrayante pour approfondir ces résultats et identifier non seulement des variants potentiels dans des gènes reconnus comme étant importants pour le développement des gonades, mais également des modifications du nombre de copies. Cependant, des analyses fonctionnelles seraient nécessaires pour déterminer si elles sont responsables du phénotype clinique de DSD.

D. Analyse de la relation entre le taux d'hormone chorionique gonadotrophique (hCG) dans le sang maternel et la survenue d'un hypospadias

Comme décrit précédemment, le développement du bourgeon génital débute à la sixième semaine de développement embryonnaire avec la tubularisation de l'urètre et la formation du gland (Kalfa et al., 2009a). Ce processus dépend fortement de la production d'androgènes par les cellules de Leydig (LC) et de la fonction de leurs récepteurs. La testostérone est principalement nécessaire à la masculinisation fœtale, à la descente testiculaire, au développement pubertaire et à la spermatogenèse (Macleod et al., 2010; Mäkelä et al., 2019). La conversion de la testostérone en 5-alpha-dihydrotestostérone est essentielle à la fermeture normale de l'urètre (Carmichael et al., 2007; Govers et al., 2019b). De plus, les cellules de Sertoli, qui ont des fonctions importantes pendant la vie fœtale, notamment la sécrétion d'hormone anti-Müllérienne (AMH), sécrètent d'autres facteurs qui jouent un rôle dans la différenciation des LC fœtales (Kilcoyne and Mitchell, 2017; Yao et al., 2002).

Les hypospadias peuvent résulter d'une mauvaise production de testostérone au cours de la vie fœtale, appelée syndrome de dysgénésie testiculaire ou TDS (*Testicular Dysgenesis Syndrome*) (Blaschko et al., 2012; Kilcoyne and Mitchell, 2017). Le TDS est défini comme une production et une action altérées des androgènes au cours de la vie fœtale et comprend la cryptorchidie, l'hypofertilité, le risque de tumeur du testicule et d'hypospadias (Hughes et al., 2012c).

L'hormone chorionique gonadotrophique (hCG) humaine est libérée par le syncytiotrophoblaste materno-placentaire. Les pics d'hCG au cours du premier trimestre de la grossesse stimulent la production de testostérone fœtale par les LC fœtales menant à un développement génital masculin normal (Kilcoyne and Mitchell, 2017; Molsberry et al., 1982; Scott et al., 2009). Des études chez l'animal suggèrent que le blocage des androgènes par le flutamide ou les phtalates, survenant au cours du stade de virilisation entre la huitième et la 14^{ème} semaines de développement embryonnaire, constitue un modèle approprié pour le TDS et entraîne l'apparition d'anomalies testiculaires et d'hypospadias (van den Driesche et al., 2017; Fisher et al., 2003; Welsh et al., 2008). Des études chez l'homme ont également signalé une

association entre l'exposition prénatale *in utero* à des perturbateurs endocriniens et des anomalies des organes génitaux de l'homme (Skakkebaek et al., 2001; Kristensen et al., 2011; Kalfa et al., 2015; Koskenniemi et al., 2015; Haraux et al., 2016). Une voie étiologique potentielle pourrait être une libération modifiée d'hCG conduisant à un déficit en androgènes (Aschim et al., 2004b; Biggs et al., 2002; Fournier et al., 2015; Fujimoto et al., 2008).

Des études limitées ont évalué l'association entre les niveaux maternels d'hCG en début de grossesse et le développement ultérieur d'un hypospadias et/ou de cryptorchidie, bien que les résultats n'aient pas été concluants. Ceci est dû en partie au petit nombre de patients inclus dans ces études (Bernstein et al., 1988; Burton et al., 1987; Chedane et al., 2014; Chen et al., 2019; Kiely et al., 1995; Schneuer et al., 2016) et aux contextes cliniques hétérogènes comprenant notamment la présence d'autres anomalies congénitales (Brouwers et al., 2010; Schneuer et al., 2016).

Parmi ces études, deux récentes ont rapporté des données intéressantes sur le lien entre les taux sériques de béta hCG libre (hCGb) et les anomalies génitales masculines. En 2016, Schneuer et al. ont conclu qu'il n'y avait pas de différence pour la médiane d'hCG chez les femmes ayant un enfant avec un hypospadias ou une cryptorchidie par rapport à celles ayant un garçon indemne, même après stratification avec suspicion de dysfonctionnement du placenta (Schneuer et al., 2016). Cependant, Chen et al. ont analysé l'hCG et l'AFP comme moyen possible combiné de dépistage prénatal de l'hypospadias et ont trouvé une association significative intéressante avec les niveaux d'hCG et d'AFP dans une cohorte de 69 enfants atteints d'hypospadias (Chen et al., 2019). Ces deux études ont examiné la corrélation entre les taux d'hCGb mesurés lors du test prénatal des aneuploïdies fœtales et l'apparition d'un hypospadias ce qui introduit un biais puisque la masculinisation est sous le contrôle de l'hCG totale et non de sa sous-unité bêta seule.

Les associations signalées entre hypospadias et petit poids de naissance, hypospadias et R.C.I.U., hypospadias et prématurité et, enfin, hypospadias et prééclampsie indiquent que le dysfonctionnement placentaire pourrait entraver le développement normal de l'urètre (Agopian et al., 2016; Akre et al., 1999; Arendt et al., 2016; Boisen et al., 2005; Chen et al., 2014; Fujimoto et al., 2008; Gatti et al.,

2001; Ghazarian et al., 2018; Hashimoto et al., 2016; Huisma et al., 2013; Krantz et al., 2004; Marrocco et al., 2015; Norris et al., 2011; Sekaran et al., 2013; Toufaily et al., 2018). Comme la relation entre l'hypospadias et l'hCG avec des ajustements pour le dysfonctionnement placentaire n'a pas été examinée dans une cohorte conséquente d'enfants, les objectifs de cette étude ont été les suivants:

- Évaluer la corrélation entre les niveaux d'hCG totale, qui a une action masculinisante, et ceux de bêta-hCG libre, seule forme disponible facilement grâce à son utilisation dans le dépistage systématique de la trisomie 21 ;
- Identifier une association entre les taux sériques de bêta-hCG libre au premier trimestre chez la mère et l'apparition d'hypospadias, et enfin ;
- Analyser si les niveaux d'hCG sont associés à la sévérité de l'hypospadias.

Notre hypothèse de départ était que l'insuffisance placentaire pourrait expliquer à la fois la survenue d'un petit poids de naissance et celle d'un hypospadias en raison d'une altération de la sécrétion d'hCG et donc d'une mauvaise stimulation de production de testostérone par le testicule fœtal.

1. Matériel et méthodes

a) Base de données

Nous avons utilisé le Registre des Malformations Congénitales de Paris (REMAPAR) (<http://www.epopé-inserm.fr/en/grandes-enquetes/registre-des-malformations-congenitales-de-paris>) qui enregistre tous les cas de malformations congénitales et d'anomalies chromosomiques parmi les enfants vivants nés après 22 SA et les M.F.I.U.. Le registre couvre la population des femmes qui vivent dans la région parisienne (Paris et sa banlieue environnante) et qui ont accouché ou ont eu une interruption de grossesse dans une maternité francilienne. Le nombre annuel d'accouchements dans cette population est d'environ 38 000.

Le registre de Paris est membre du JRC - Réseau Européen de registres des malformations congénitales (<https://eu-rd->

platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat) et du Centre International d'Information pour la Surveillance et la Recherche des Anomalies Congénitales (<http://www.icbdsr.org/>). Le registre suit la méthodologie EUROCAT et la qualité des données est régulièrement contrôlée à la fois par EUROCAT et par le Comité National des Registres Français. La révision des procédures concernant la confidentialité des données a été approuvée à la fois par le Comité National des Registres et par le Comité National de l'Informatique et des Libertés (autorisation n° DR-2016-393, octobre 2016). Les données sont basées sur les dossiers médicaux et proviennent de plusieurs sources, notamment les maternités, les services de néonatalogie, les services de chirurgie pédiatrique et d'urologie pédiatrique, les services de cytogénétique, de fœtopathologie et de biochimie. Lorsqu'elles sont disponibles, ces données incluent le taux de bêta-hCG (hCGb) dans le sang maternel exprimé en multiples de la médiane (MoM) en tant que composante du dépistage prénatal du syndrome de Down, corrigée en fonction du poids de la mère et de son statut tabagique. Ce dépistage est systématiquement proposé pour toute grossesse en France. Un consentement éclairé aux tests biochimiques a été obtenu pour chaque patiente avant le prélèvement de sang dans le cadre des soins prénatals de routine.

b) Population étudiée

Nous avons obtenu les données auprès du REgistre des MAIformations congénitales de PARis (REMAPAR) pour les années 2011 - 2016. La population initiale de l'étude comprenait 3172 femmes enceintes ayant donné naissance à un enfant de sexe masculin né vivant avec une malformation congénitale (Figure 31).

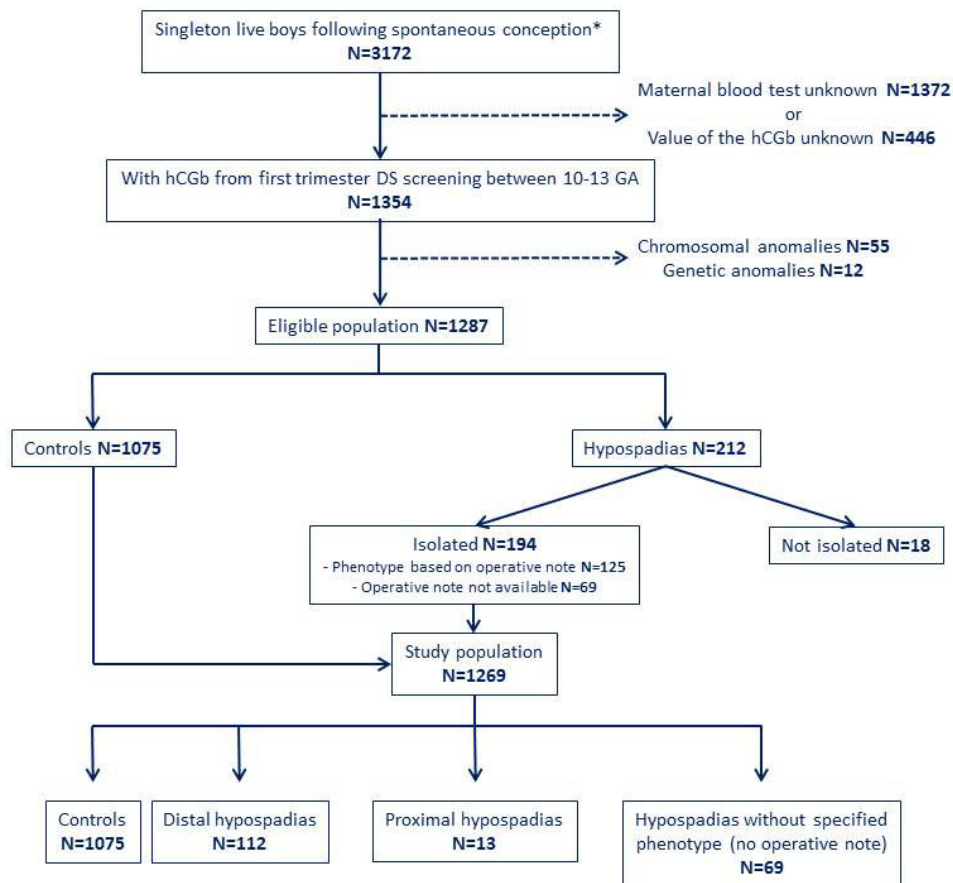


Figure 31. Caractéristiques de la population REMAPAR.

*Les cas nés après PMA ont été exclus

DS, Down syndrome; GA, gestational age; hCGb, free beta-hCG; N, number.

Après exclusion des cas sans taux d'hCGb connu, des grossesses issues de Procréation Médicalement Assistée (PMA) et de celles présentant des anomalies chromosomiques ou génétiques, la population de l'étude comprenait 194 garçons nés avec un hypospadias isolé et un groupe témoin comptabilisant 1075 garçons. Dans les cas pour lesquels un compte-rendu opératoire était disponible (N = 125), nous avons obtenu des données sur le type d'hypospadias, permettant ainsi une classification basée sur l'emplacement du méat urétral, en utilisant le code Q54 de la CIM-10 de la Classification Internationale des Maladies. Les cas ont été classés par gravité en deux phénotypes: (i) distal, comprenant les hypospadias glandulaires, balaniques (Q54.0) et péniers moyens (Q54.1), et (ii) proximal, qui comprenait les formes pénoscrotales (Q54.2) et périnéales (Q54.3). Enfin, les cas pour lesquels le phénotype n'a pas pu être confirmé faute de compte-rendu opératoire ont été classés comme non spécifiés.

c) Résultat principal et variables étudiées

Le résultat principal était la différence de MoM d'hCGb entre les garçons nés avec un hypospadias par rapport au groupe témoin. Les objectifs secondaires étaient d'analyser la MoM d'hCGb selon la sévérité de l'hypospadias et selon la présence d'une insuffisance placentaire.

d) Analyse statistique

En utilisant la régression quantile, nous avons comparé les valeurs médianes des MoM d'hCGb mesurées entre 10 et 13 SA pour l'ensemble de la cohorte, ainsi que par type d'hypospadias par rapport groupe témoin. Nous avons également pris en compte les effets possibles de l'âge maternel, de la présence d'un RCIU ou d'une naissance prématurée (ces deux derniers facteurs pouvant être considérés comme des stigmates d'un dysfonctionnement placentaire) en tant que facteurs de confusion potentiels. La signification statistique a été fixée à une valeur de $p < 0,05$. Toutes les analyses ont été effectuées avec Stata (Stata 12.1; StataCorp, College Station, TX, États-Unis).

2. Résultats

a) Béta-hCG libre et hCG totale

La bêta-hCG libre du premier trimestre chez la mère a été obtenue à partir du dépistage de la trisomie 21. Comme l'activité biologique sur le développement testiculaire n'est possible qu'avec l'hCG totale, une corrélation entre cette dernière et l'hCGb a été évaluée. La distribution des niveaux d'hCG totale et d'hCG bêta libre a montré une corrélation linéaire entre les deux dosages.

Aucune différence significative n'a été démontrée entre les taux sériques chez les femmes ayant donné naissance à un enfant souffrant d'hypospadias

et ceux dans le groupe témoin (Figure 32). Les taux d'hCGb ont donc pu être utilisés pour traduire le niveau d'hCG totale et le degré de masculinisation qui en découle.

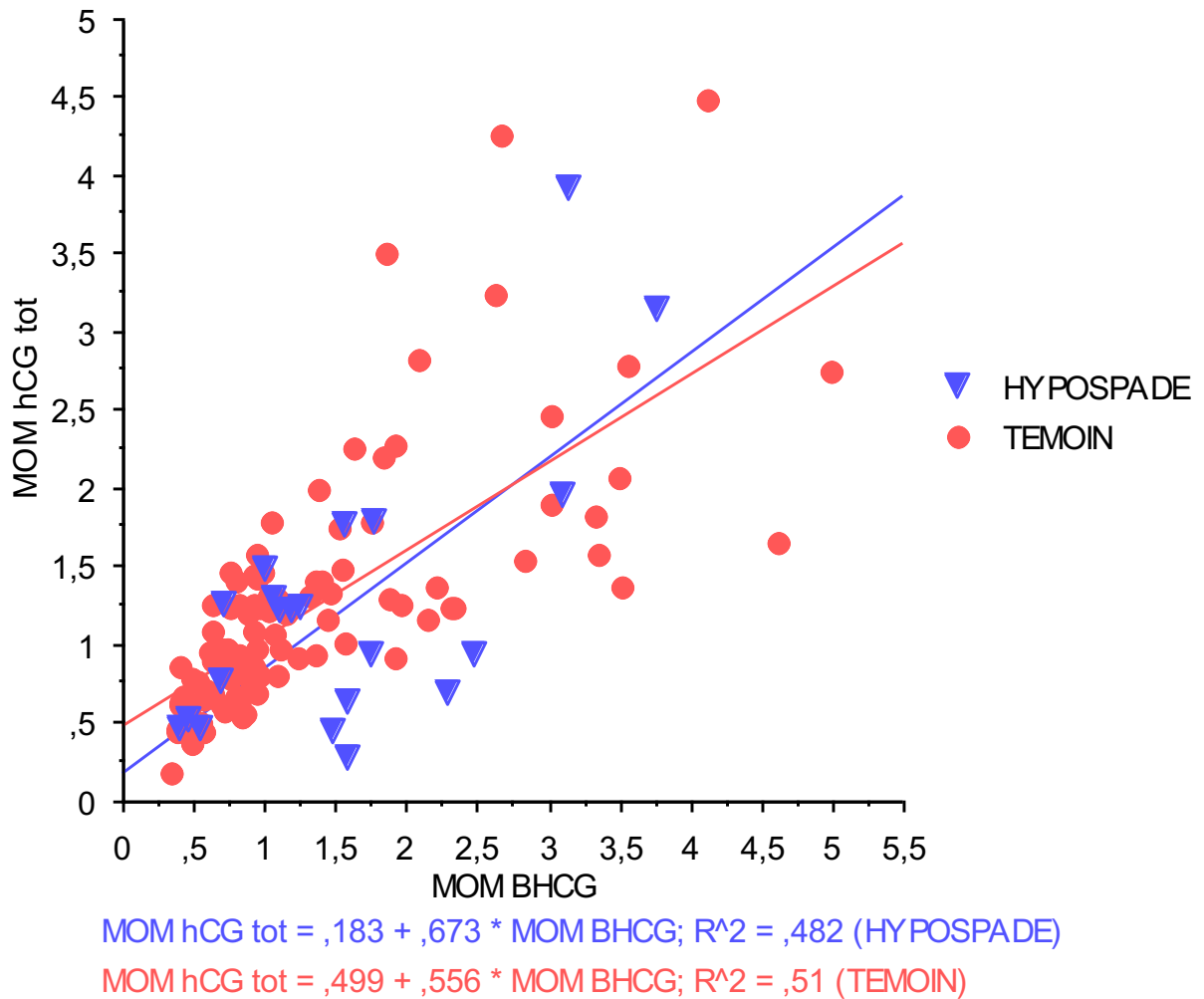


Figure 32. Corrélation entre le taux sérique maternel d'hCG total et beta libre chez des femmes enceintes ayant donné naissance à un enfant né vivant avec un hypospadias et un groupe contrôle.

b) Bêta-hCG libre et hypospadias

La prévalence globale des hypospadias était de 40,3 pour 10000 naissances masculines. Parmi ceux-ci, 194 échantillons ont été recueillis entre 10 et

13 SA. Parmi ceux-ci, 112 (58%), 13 (7%) et 69 (35%) ont été enregistrés avec un diagnostic d'hypospadias distal, proximal et non spécifié, respectivement.

Globalement, la médiane (IQR) des MoM d'hCGb était de 0,99 (0,68 - 1,49) chez les femmes ayant un bébé né avec hypospadias contre 0,95 (0,64 - 1,38) chez les garçons non touchés ($p=0,3$, Tableau 17).

	Hypospadias				Contrôles 1075
	Distal N=112	Proximal N=13	Non spécifié N=69	Total N=194	
Médiane	0,92	1,49	1,05	0,99	0,95
Interquartile range	0,69-1,32	0,94-2,42	0,62-1,51	0,68-1,49	0,64-1,38

Tableau 17. Distribution de l'hCGb libre sérique (en multiples de la médiane (MoM)).
hCGb, beta-hCG libre; MoM, multiples de la médiane; N, nombre.

En revanche, nous avons constaté une augmentation statistiquement significative de la médiane des MoM d'hCGb dans le cas d'hypospadias sévères proximaux. La médiane (IQR) de MoM d'hCGb était de 1,49 (0,94 - 2,42) dans les hypospadias proximaux contre 0,92 (0,69 - 1,32) dans les hypospadias distaux et de 1,05 (0,62 - 1,5) pour les hypospadias pour lesquels nous n'avons pas de compte-rendu opératoire pour en confirmer le type ($p=0,02$) (Tableau 18).

	Non ajusté			Ajusté		
	Coefficient	95% CI	p	Coefficient	95% CI	p
Contrôles	Ref		0,33	Ref		0,60
Total hypospadias	0,05	-0,05-0,15		0,03	-0,07-0,13	
Contrôles	Ref		0,02	Ref		0,03
Distal confirmé	-0,03	-0,16-1,00		-0,01	-0,14-0,12	
Proximal confirmé	0,54	0,18-0,90		0,53	0,16-0,90	
Non spécifié	0,10	-0,06-0,26		0,09	-0,07-0,25	

Ajusté pour petit poids de naissance, prématurité et âge maternel

Tableau 18. Différences sans et après ajustement du taux sérique des multiples de la médiane (MoM) de la béta-hCG libre (hCGb) pour les différents phénotypes d'hypospadias en comparaison avec une population contrôle (régression quantique).

CI, confidence interval; hCGb, free beta-hCG; MoM, multiples of median; p, p-value; Ref, reference.

Cette association est restée significative statistiquement après ajustement pour la prématurité et le retard de croissance intra-utérin considérés comme témoins du dysfonctionnement placentaire (p=0,03) (Tableau 19).

	Hypospadias				Contrôles
	Confirmé Distal	Confirmé Proximal	Non spécifié	Total	
	112	13	69	194	1075
	%	%	%	%	%
Petit poids de naissance	18,7	23,1	21,7	20,1	8,8
Prématurité	7,1	30,8	7,2	8,8	11,4
Age maternel (ans)					
≤ 29	24,1	15,4	26,1	24,2	26,5
30-34	50,9	30,8	33,3	43,3	43,4
≥ 35	25,0	53,8	40,6	32,5	30,1

Tableau 19. Relation entre l'hypospadias et les paramètres de dysfonction placentaire (prématurité, petit poids de naissance, âge maternel).

Les hypospadias proximaux ont donc finalement été associés à une médiane de MoM d'hCGb significativement plus élevée que les hypospadias distaux, que ce soit sans ajustement (0,57, 95% IC, 0,19-0,95, $p = 0,003$) ou après stratification selon l'insuffisance placentaire (0,54, 95% IC, 0,16-0,92, $p = 0,006$).

3. Discussion

Plusieurs auteurs ont suggéré que l'hypospadias pouvait être causé par des niveaux anormaux d'hormones pendant la grossesse résultant d'une altération de la fonction placentaire ou d'une exposition à des perturbateurs endocriniens (Akre et al., 1999; Czeizel et al., 1979; Klip et al., 2002). L'hCG est produite par le placenta et est chimiquement similaire à la *Luteinizing Hormone* (LH). Elle joue un rôle majeur dans la différenciation sexuelle du fœtus et stimule le testicule fœtal. Par conséquent, des taux réduits d'hCG ont été suggérés comme une explication possible dans l'étiologie de l'hypospadias (Czeizel et al., 1979).

La sécrétion de testostérone fœtale est sous l'influence de l'hCG placentaire au cours des 14 premières semaines de gestation (Brouwers et al., 2010). Des études portant sur 54 fœtus masculins normaux ont montré que les niveaux de testostérone fœtale diminuaient entre 11 et 19 semaines de gestation, parallèlement à une diminution de la sécrétion d'hCG (Fowler et al., 2009). La masculinisation des organes génitaux externes chez l'homme dépend de la formation de la 5-alpha-dihydrotestostérone par deux voies : premièrement, une voie androgénique principale par la synthèse de la testostérone par le testicule fœtal et, deuxièmement, par une voie alternative dans laquelle l'androstérone représente le principal « *backdoor* » androgénique et est principalement sécrétée par le placenta par métabolisme de la progestérone (Auchus and Miller, 2012; O'Shaughnessy et al., 2019; Thankamony et al., 2016). Par conséquent, la masculinisation fœtale est le résultat de la sécrétion d'hormones stéroïdiennes par le testicule et le placenta, ce qui explique pourquoi les dysfonctionnements de ce dernier peuvent être associés à des anomalies du développement du tubercule génital et à des hypospadias.

Les altérations de la voie de « sensibilité » aux androgènes sont une autre cause possible des modifications de la masculinisation fœtale. Des mutations du gène du récepteur aux androgènes *AR* ont été décrites comme une cause rare d'hypospadias isolés, même si cela se voit dans des formes mineures (Kalfa et al., 2013; Lek et al., 2014). Cela pourrait expliquer pourquoi le placenta produit des niveaux élevés d'hCG pour augmenter la production de testostérone (Kalfa et al., 2013). Certains auteurs ont même qualifié cette théorie de « syndrome idiopathique d'insensibilité partielle aux androgènes » et ont signalé une association avec l'exposition prénatale à des perturbateurs endocriniens provenant de l'environnement (Gaspari et al., 2011). L'hypospadias apparaît donc comme une conséquence de la production d'androgènes et/ou d'un défaut de sensibilité dont les multiples causes, tant génétiques qu'environnementales, nécessitent l'étude d'une cohorte plus nombreuse d'enfants atteints.

Grâce à l'utilisation d'un grand registre populationnel basé sur registre parisien de femmes ayant donné naissance à un enfant souffrant de malformation congénitale, notre étude est l'une des plus grandes études en population analysant l'association entre les taux sériques maternels de bêta-hCG du premier trimestre chez la mère et la survenue d'un hypospadias (Tableau 20).

Année	Auteurs	Cohorte	Contrôles	Total H.	Prox.	Dist.	Association globale entre hCGb et H. vs. contrôles	Après ajustement pour dysfonction placentaire	Selon la sévérité de H	Limites
1995	Kiely et al., 1995	Non	96	26	ND	ND	Pas de corrélation	ND	ND	Pas de groupe contrôle, pas de stratification, pas de valeurs
2016	Schneuer et al., 2016	Registre populationnel	22,450	167	9	130	Pas de corrélation 0.83-0.88 MoM vs. 0.92-0.88 MoM (p=0.83-0.76)	Pas de corrélation	Tendance plus élevée si prox. (OR 4.34 (1.08-17.4))	Registre très robuste; faible nombre de prox. (distribution?); qualité de mesures des SA
2019	Chen et al., 2019	Non	62	69	ND	ND	Significativement plus élevée 1.3 MoM vs. 0.84 (p=0.004)	ND	ND	Pas de registre populationnel
2019	Current study	Registre populationnel	1075	194	13	112	Pas de corrélation 0.99 MoM vs. 0.95 (p=0.3)	Corrélation significative (p=0.03)	Significativement plus élevée si prox. (1.49 MoM vs. 0.92, p=0.006 après ajustement)	Groupe contrôle compose de malformations congénitales, pas de prise en compte des autres risques; faible nombre de prox.

Tableau 20. Résumé des études précédemment publiées rapportant l'association entre le taux maternel sérique de la bêta-hCG au premier trimestre et la survenue d'un hypospadias.

Dist., distal ; H., hypospadias; hCG, hormone chorionique gonadotrophin; hCGb, free beta-hCG; MoM, multiple of the median; ND, not determined; OR, odd ratio; p, p-value; prox., proximal; SA, semaine d'aménorrhée; vs., versus.

La base de données utilisée était précise, fiable, en très bon accord avec les dossiers médicaux comme l'ont montré les audits externes demandés par les fonds de bourses de recherche européen. De plus, nos taux d'hypospadias et leur distribution par type (distal, moyen et proximal respectivement) étaient similaires et cohérents avec la prévalence en Europe (Yu et al., 2019).

La population de notre étude était bien définie pour éviter toute modification du taux sérique de bêta-hCG libre : aucune grossesse aboutissant à une interruption, à la mort fœtale ou à l'accouchement d'un enfant présentant une malformation chromosomique ou génétique n'a été incluse. De plus, nous avons décidé de ne pas inclure les grossesses obtenues par PMA et les grossesses gémellaires qui sont connues pour donner des valeurs non fiables d'hCG (Cavoretto et al., 2017; Prats et al., 2012). La lecture du dossier médical et du compte-rendu opératoire avec l'aide d'un urologue pédiatrique a rendu notre registre plus robuste grâce à une meilleure classification des hypospadias. Habituellement, la distribution des hypospadias comprenait : distal, pénien moyen, pénoscrotal et scrotal. De nos jours, une classification basée sur l'organogenèse semble plus fiable, se divisant en deux groupes principaux : pénien (distal et moyen) et proximal lorsque le méat est situé en position pénoscrotale ou périnéale (Orkiszewski, 2012). Le profil hormonal est en effet différent entre les hypospadias isolés et les hypospadias syndromiques (Ratan et al., 2012). Cette classification correspond aux nouvelles découvertes en génétique, car les CNVs, les SNPs et les mutations de gènes potentiellement impliqués dans la survenue d'un hypospadias sont significativement liés à la sévérité de l'hypospadias avec une modification certaine du profil hormonal (Singh et al., 2018).

Nos résultats concluent qu'après ajustement pour le dysfonctionnement placentaire, les taux de hCG sont significativement plus élevés dans tous les cas d'hypospadias et plus particulièrement dans les cas d'hypospadias sévères. En effet, même si la première analyse statistique ne montrait pas d'association globale entre les taux sériques maternels de bêta-hCG libre prélevés lors du premier trimestre de grossesse et la survenue d'un hypospadias, une corrélation significative a été constatée après ajustement pour insuffisance placentaire et par type d'hypospadias. Ces résultats sont proches de ceux de Schneueur et al., même si leurs travaux n'ont

pas montré de valeur significative dans un registre basé sur la population totale (Schneuer et al., 2016; Yinon et al., 2010b). Le résultat principal est donc que les taux de bêta-hCG libre sont modifiés dans les cas d'hypospadias après stratification pour insuffisance placentaire. L'hypospadias n'est clairement donc pas la conséquence d'un dysfonctionnement isolé du placenta même si Hashimoto et al. ont signalé en 2016 que le RCIU - mais pas la prématurité - pouvait constituer un facteur de risque d'hypospadias sévère (Hashimoto et al., 2016).

Théoriquement, le dysfonctionnement du placenta réduit le niveau d'hCG (Toufaily et al., 2018). Cependant, nos résultats suggèrent qu'un niveau plus élevé de bêta-hCG libre pourrait être le reflet d'une « insensibilité idiopathique partielle aux androgènes », cette dernière étant la cause principale d'une hypovirilisation de l'urètre.

La principale limite de cette étude est la taille réduite de l'échantillon pour les hypospadias proximaux, ce qui pourrait affecter la robustesse des résultats. En outre, il s'agit d'une étude rétrospective qui a collecté des données cliniques et biologiques à partir de dossiers médicaux susceptibles d'aboutir à des informations maternelles et postnatales insuffisantes. Le diagnostic basé sur l'examen néonatal peut contribuer à des erreurs systématiques telles que la sous-notification ou la sur-déclaration, ainsi qu'une classification erronée des hypospadias. Tous nos patients avec une classification cohérente ont été identifiés à partir du compte-rendu opératoire et pourraient refléter un biais de sélection. Il est possible que certains enfants atteints d'hypospadias, en particulier de phénotypes moins graves, n'aient pas consulté un urologue pédiatrique et notre incidence de 2,14 ‰ (1 naissance pour 467 naissances vivantes) pourrait représenter une sous-estimation de l'incidence réelle. De plus, notre groupe témoin comprenait tout patient présentant des anomalies congénitales de notre cohorte REMAPAR. Le type d'anomalies congénitales susceptibles d'influencer les taux de hCG n'est pas clairement défini. Enfin, aucune donnée sur d'autres facteurs connus n'a été analysée : antécédents familiaux d'hypospadias, multiparité, indice de masse corporelle (IMC) élevé, hypertension maternelle, statut tabagique, traitement médicamenteux conduisant à l'hypospadias (médicaments antiépileptiques, analgésiques, traitement antihypertenseur), ou exposition à des perturbateurs endocriniens, qui sont tous des facteurs pouvant jouer un rôle dans l'étiologie de l'hypospadias (Agopian et al., 2016; Arendt et al., 2017b; Fowler et al., 2009; Kalfa et

al., 2015; Kristensen et al., 2011; Ollivier et al., 2018). Cependant, cette étude souligne l'importance d'un registre basé sur la population et de la collaboration entre épidémiologistes, généticiens, urologues pédiatres et obstétriciens.

Étant donné que la cohorte comprenait un petit nombre de patients affectés pour les cas les plus sévères, des études supplémentaires seront nécessaires et ces résultats préliminaires doivent être interprétés avec prudence. Des recherches approfondies sur des gènes candidats, les mécanismes épigénétiques, les facteurs environnementaux et les perturbateurs endocriniens pourraient aider à fournir des indices sur l'étiologie de l'hypospadias qui méritent d'être approfondis.

Ce travail a été soumis pour publication à la revue *Journal of Urology* et est actuellement en cours de révisions avec des modifications mineures.

E. Étude de cas familiaux et/ou consanguins d'hypospadias par séquençage d'exome (WES)

Avec les progrès des techniques de séquençage (NGS : *Next Generation Sequencing*), la recherche des causes génétiques d'une pathologie donnée est passée rapidement du séquençage de quelques gènes candidats selon la technique de Sanger à celui de panels de gènes, jusqu'à quelques dizaines, en NGS et maintenant à celui de la totalité des séquences codantes du génome connu sous le nom de séquençage d'exome ou WES (*Whole Exome Sequencing*). Il est probable que cette dernière technique laissera la place au séquençage de la totalité du génome ou WGS (*Whole Genome Sequencing*).

Si la réalisation technique du WES ou du WGS ne pose plus de problème majeur, l'interprétation des données qui en sont issues est, quant à elle, un défi de taille car le NGS met en évidence un nombre considérable de variants nucléotidiques dont il importe ensuite de déterminer ceux qui ont réellement une valeur pathologique. Une des stratégies consiste donc à étudier des cas familiaux en trio de façon à établir, par l'analyse de la ségrégation de ces variants dans une famille donnée, ceux qui ont le plus de risque d'être impliqués dans la pathologie étudiée. Des études fonctionnelles et la recherche de mutations chez des patients tout venants viennent ensuite confirmer ou infirmer les résultats obtenus en NGS. Une autre stratégie, visant à rechercher des mutations à transmission récessive, consiste à analyser des patients consanguins après avoir recherché chez eux, grâce par exemple à l'utilisation de puces SNP, les régions à l'état homozygote.

Combinant ces deux stratégies, notre étude a porté sur un certain nombre de familles comportant soit plusieurs cas d'hypospadias dans la fratrie ou chez le père, soit des cas d'hypospadias chez des individus apparentés.

1. Méthodes

a) Cohortes de patients

Cette étude a concerné 30 patients atteints d'hypospadias répartis sur deux cohortes correspondant aux centres hospitaliers de recrutement :

- 20 patients pour les services d'urologie pédiatrique et de chirurgie viscérale pédiatrique de l'Hôpital Universitaire Robert-Debré, de l'Hôpital des Enfants Malades – Necker et de l'Hôpital d'Enfants Armand Trousseau (Assistance Publique - Hôpitaux de Paris), et ;
- 10 pour le service de Chirurgie Viscérale Pédiatrique du Centre Hospitalo-Universitaire de Montpellier.

Ces patients ont été inclus en raison d'éléments familiaux suggérant une étiologie génétique : patients consanguins ou cas familiaux. La cohorte de Paris comprenait ainsi dix patients consanguins et cinq familles (trois fratries et deux duos père-fils) ; la cohorte de Montpellier comprenait cinq familles (trois duos de cousins, un duo de petits-cousins, et un duo père-fils). Dix-sept de ces patients ont bénéficié au préalable d'une analyse du caryotype et d'une ACPA (Analyse Chromosomique sur Puce à ADN) sur puces SNP-array (Illumina®) qui n'ont pas mis en évidence de grand remaniement génomique. Les WES (Whole Exome Sequencing) ont été réalisés en solo pour les patients consanguins, et en duos pour les cas familiaux.

b) Séquençage

Les ADN extraits ont été adressés à la société Integragen® (Évry, France) pour la cohorte de Paris et au CNG (Centre National de Génotypage) (Évry, France) pour la cohorte de Montpellier pour un séquençage d'exomes constitutionnels.

Séquençage chez Integragen®

L'ADN génomique des 15 patients a été capturé en utilisant le kit Twist Human Core Exome Enrichment System (Twist Bioscience, San Francisco, CA, USA) (Gnirke et al., 2009). Chaque ADN génomique (150 ng) a été fragmenté par sonication et purifié pour produire des fragments de 150 à 200 pb. Les fragments ont ensuite été liés à des adaptateurs oligonucléotidiques du kit NEBNext® Ultra II (New England Biolabs®, Ipswich, MA, USA). Les bibliothèques ainsi obtenues ont été purifiées et enrichies par sept cycles de PCR. Puis, 500 ng de chaque bibliothèque purifiée ont été hybridés avec les sondes de capture pendant 16 heures. Après hybridation, lavage et élution, les bibliothèques ont été amplifiées par huit cycles de PCR, puis purifiées et quantifiées par qPCR, avant d'être séquencées sur NovaSeq (Illumina®, San Diego, CA, USA) et analysées avec Illumina Real Time Analysis (3.4.4) (San Diego, CA, USA).

Séquençage au CNG

Le procédé de séquençage a été sensiblement identique mais l'ADN génomique a été capturé à l'aide du kit Sure Select Human All Exon V5 (Agilent® Santa Clara, CA, USA) et le séquenceur utilisé était un HiSeq4000 (Illumina®, San Diego, CA, USA).

c) Traitement bio-informatique préalable par Integragen®

Les séquences ont été alignées au génome humain (hg38) grâce à l'outil Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Les duplicons ont été retirés grâce à l'outil Sambamba. Puis, les SNVs (Single Nucleotide Variations) et les petites insertions et délétions (jusqu'à 20 pb) ont été identifiés grâce à l'outil GATK Haplotype Caller GVCF du Broad Institute. Les variants ont par la suite été annotés grâce au programme VEP (Variant Effect Predictor, VEP 95.1) de Ensembl qui permet de déterminer les effets des variants sur les transcrits et protéines, et prédire leurs conséquences fonctionnelles. Ce programme prend en compte les données de gnomAD, du projet 1000 Genomes et de la base de données Kaviar. D'autre part, l'équipe bio-informatique d'Integragen® a utilisé sa propre base de données pour éliminer les

artéfacts de séquençage. Enfin, les variants ont été annotés avec cinq algorithmes de pathogénicité (DANN, FATHMM, MutationTaster, SIFT et Polyphen), avec les données cliniques et pathologiques de ClinVar, ainsi qu'avec des informations supplémentaires telles que le score de qualité, le statut hétérozygote/homozygote, le nombre de reads par allèle et le score RegulomeDB.

d) Analyse des données issues du WES

Le séquençage en WES a produit une moyenne de 8,2 Gb de séquences par échantillon. La couverture moyenne observée pour les 30 échantillons était de 110X (minimum 88X), avec en moyenne 99,8% de couverture supérieure à 25X. La qualité globale du séquençage évaluée par le Q score était de 36,2 avec 95% de bases ayant un score ≥ 30 .

Les variants ont été filtrés selon leur fréquence allélique dans les bases de données publiques (1000G Global, 1000G Ethnical, gnomAD Global, gnomAD Ethnical, Kaviar), selon leur statut homozygote/hétérozygote et selon leur ségrégation pour les cas familiaux. Les variants ainsi retenus ont ensuite été filtrés selon leur pathogénicité grâce aux prédicteurs Polyphen et Mutation Taster (Adzhubei et al., 2013; Schwarz et al., 2010). Ont ensuite été étudiés les gènes contenant ces variants sensiblement pathogènes, grâce à des données issues de OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Man) ou de la littérature, et nous les avons comparés à une liste de gènes candidats préalablement établie. Ces gènes ont ainsi été classés en quatre catégories selon leur potentielle implication dans l'hypospadias :

- Les gènes classés dans la catégorie A sont des gènes impliqués ou très probablement impliqués dans l'hypospadias ;
- Les gènes de la classe D sont des gènes qui n'ont pas de rapport avec l'hypospadias ;
- Les classes B et C sont des classes intermédiaires.

Nous avons gardé les variants situés dans les classes A et B pour analyse complémentaire.

Ces variants ont été étudiés à l'aide du logiciel Alamut® et filtrés selon des données de fréquences ethniques (GnomAD 2.1), de conservation nucléotidique (PhiloP) ou de l'acide aminé, et de modification protéique (score de Gantham) pour les mutations faux sens, ainsi que des données d'épissage (SpliceSiteFinder, MaxEntScan, NNSPLICE, GeneSplicer, Human Splicing Finder) afin d'identifier les meilleurs variants candidats. Les variants ont également été catégorisés selon les recommandations de l'American College of Medical Genetics and Genomics : pathogènes, probablement pathogènes, de signification incertaine, probablement bénins ou bénin. Les mutations non-sens et les mutations entraînant un décalage du cadre de lecture ont été considérées comme pathogènes. Enfin, les variants hétérozygotes ont été soumis à une sélection reposant sur la pLI (*probability of being loss-of-function intolerant*) et le rapport *observed / expected* (oe) obtenus grâce à la base de données gnomAD.

Patients consanguins (Patients 1 à 10)

L'hypothèse d'une transmission récessive étant probable pour les dix patients consanguins, seuls ont été conservés dans un premier temps les variants homozygotes dont la fréquence était inférieure à 5% dans les bases de données, pour étude des variants concernant des gènes de classe A et B.

Dans un second temps, la sélection a été étendue aux variants dont la fréquence était inférieure à 10%, en ne s'intéressant qu'aux variants qui apparaissaient les plus pathogènes selon le type de variation (*Splice acceptor, Splice donor, Stop gained, Stop lost, Start lost, Frameshift*) ou selon les logiciels de prédiction (exclusion des variants bénins selon Polyphen ou Mutation Taster).

Enfin, n'ont été conservés que les variants qui concernaient des gènes de classe A et B.

A ensuite été émise l'hypothèse d'une transmission dominante chez les patients consanguins, avec étude des variants hétérozygotes ou hémizygotés dont la fréquence dans les bases de données était inférieure à 1%. Ces variants ont été comparés à la liste de gènes candidats pour sélectionner ceux qui concernaient des gènes intéressants, puis ont été gardés s'ils apparaissaient pathogènes [exclusion des variants bénins selon Polyphen ou Mutation Taster, exclusion des gènes dont le rapport o/e n'était pas en faveur d'une pathogénicité à l'état hétérozygote ($o/e > 0.35$)]

Cas familiaux

Ils sont représentés dans la Figure 33.

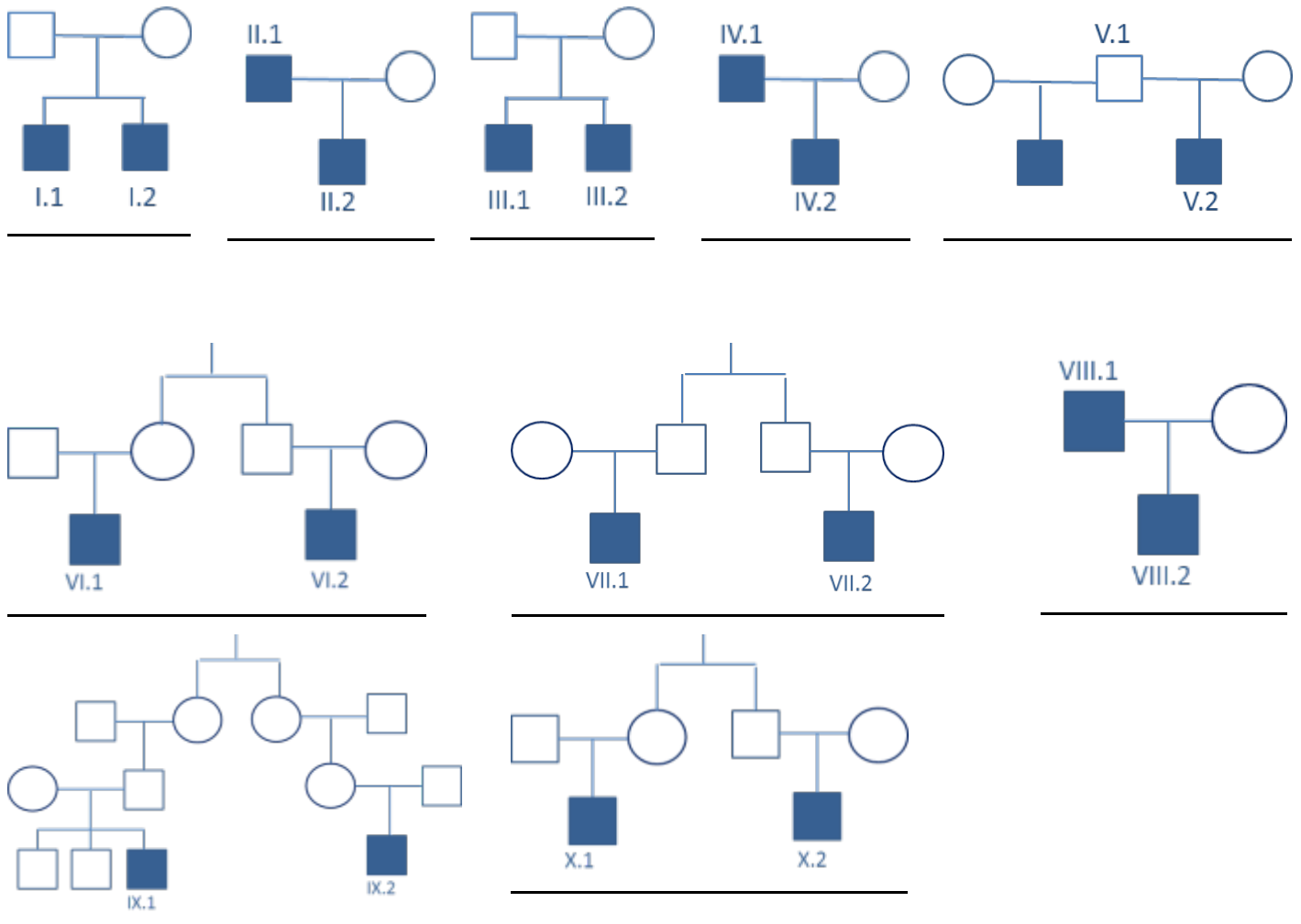


Figure 33. Représentation des cas familiaux d'hypospadias.

Pour chaque duo a été émise l'hypothèse d'une transmission dominante avec étude des variants hétérozygotes présents chez les deux sujets atteints. Parmi ces variants ont été éliminés ceux qui étaient classés bénins selon Polyphen ou Mutation Taster, et ceux dont la fréquence était supérieure à 1% dans gnomAD. Ont ensuite été étudiés les variants concernant des gènes de classes A et B, avec élimination de ceux qui avait une fréquence allélique supérieure à 1% dans au moins un groupe ethnique selon GnomAD. Enfin, ont été gardés les variants situés dans des gènes dont le rapport o/e était en faveur d'une pathogénicité à l'état hétérozygote ($o/e < 0,35$).

2. Résultats

Le WES a permis de mettre en évidence 22 variants, répertoriés dans le Tableau 21, dont :

- quatre variants homozygotes ;
- un variant hémizygote, et ;
- 17 variants hétérozygotes.

Parmi ces variants il y avait 17 faux-sens, deux délétions entraînant un décalage du cadre de lecture, une délétion, une insertion sans décalage du cadre de lecture et une mutation non-sens.

Parmi les gènes concernés, il y avait :

- un gène déjà identifié dans l'hypospadias ;
- trois gènes candidats identifiés par des études d'expression ;
- quatre gènes impliqués dans la voie des androgènes
- cinq gènes impliqués dans la voie des œstrogènes dont deux gènes identifiés par des études de GWAS (*Genome Wide Association Study*) ;
- trois gènes candidats pour des anomalies du développement sexuel, et ;
- trois gènes appartenant à des voies de signalisation potentiellement impliquées dans la pathogenèse de l'hypospadias.

Gene	HGVSc	Chrom.	Conséquences	rs	Patient	Statut	ACMG
RTN4	NM_007008.2:c.230G>C	chr2	missense_variant	rs11549898	7	Homozygote	VUS
CRIPAK	NM_175918.3:c.645_648del	chr4	frameshift_variant	rs753152931	10	Homozygote	Pathogène
NR5A2	NM_205860.2:c.998G>C	chr1	missense_variant	rs61755054	8	Homozygote	VUS
ZFH3	NM_006885.3:c.5555A>C	chr16	missense_variant	rs61737017	3	Homozygote	bénin
MAMLD1	NM_001177465.2:c.1216C>T	chrX	missense_variant	rs144862058	1	Hémizygote	Prob. bénin
ARFGEF3	NM_020340.4:c.3781G>A	chr6	missense_variant	rs147280676	I.1 et I.2	Hétérozygote	VUS
CYR61	NM_001554.4:c.947C>G	chr1	missense_variant	rs148330006	II.1 et II.2	Hétérozygote	VUS
DEPP1	NM_007021.3:c.580_585dup	chr10	inframe_insertion	rs1295593771	III.1 et III.2	Hétérozygote	VUS
EPB41L2	NM_001431.3:c.1903G>A	chr6	missense_variant	rs765749982	V.1 et V.2	Hétérozygote	VUS
HERPUD1	NM_001010989.2:c.485C>T	chr16	missense_variant	rs200238021	IV.1 et IV.2	Hétérozygote	VUS
PER1	NM_002616.2:c.460C>T	chr17	missense_variant	rs147306825	V.1 et V.2	Hétérozygote	VUS
SOX8	NM_014587.4:c.1144G>A	chr16	missense_variant	rs143203270	I.1 et I.2	Hétérozygote	VUS
WNT1	NM_005430.3:c.1007C>T	chr12	missense_variant	rs148154047	II.1 et II.2	Hétérozygote	VUS
ZFH3	NM_006885.3:c.311C>T	chr16	missense_variant	rs141939410	II.1 et II.2	Hétérozygote	VUS
ZNF318	NM_014345.2:c.1576C>T	chr6	missense_variant	rs151197319	I.1 et I.2	Hétérozygote	VUS
DMRT2	NM_181872.4:c.1300C>G	chr9	missense_variant	rs147461872	4	Hétérozygote	VUS
GLI2	NM_005270.4:c.2491_2493del	chr2	inframe_deletion	rs770837314	4	Hétérozygote	VUS
ZEB1	NM_001323653.1:c.41C>T	chr10	missense_variant	rs370082712	5	Hétérozygote	VUS
EPB41L4B	NM_019114.4:c.2014C>T	chr9	stop_gained	rs921541583	9	Hétérozygote	Pathogène
CTGF	NM_001901.2:c.712A>G	chr6	missense_variant	rs769805883	7	Hétérozygote	VUS
PELP1	NM_014389.2:c.75_87del	chr17	frameshift_variant	rs554870108	VIII.1 et VIII.2	Hétérozygote	Pathogène
ZNF521	NM_001308225.1:c.344C>T	chr18	missense_variant	rs770777399	VI.1 et VI.2	Hétérozygote	VUS

Tableau 21. Variants candidats découverts par l'étude d'exome.

Chrom., chromosome ; HGVS, Human genome variation society; rs, Reference SNP (single nucleotide polymorphism); VUS, variant of uncertain significance

3. Discussion

Variants de transmission récessive (N=4)

Cette étude a mis en évidence quatre variants candidats de transmission récessive dans les gènes *ZFH3*, *CRIPAK*, *RTN4*, et *NR5A2*.

Le variant rs61737017 dans *ZFH3* a été conservé car, bien qu'il apparaisse bénin ou pathologique selon les logiciels de prédiction, il entrainerait la création d'un site accepteur d'épissage selon SSF et MaxEnt. Sa fréquence ethnique maximale est de 10,94%, ce qui donne une fréquence des homozygotes à 0,25%. Le gène *ZFH3* inhibe le récepteur aux œstrogènes, et il est significativement associé à l'hypospadias dans une étude GWAS (Dong et al., 2010; Geller et al., 2014).

D'autre part, il est à noter qu'un variant supplémentaire, rs79300175, dans le gène *CRIPAK*, a été retrouvé à l'état homozygote chez deux patients alors que sa fréquence maximale dans gnomAD est de 0,94% (Schwarz et al., 2010; Sirianni et al., 2002). L'expression du gène *CRIPAK* semble être régulée par les œstrogènes, et la protéine semble également agir sur le récepteur aux œstrogènes (Talukder et al., 2006).

Le gène *RTN4* fait partie des 24 gènes surexprimés dans les tissus péniens chez les patients atteints d'hypospadias (Karabulut et al., 2013).

Enfin, le gène *NR5A2* active la transcription des gènes codant pour les enzymes de la stéroïdogénèse (Duggavathi et al., 2008; Lin and Achermann, 2008; Sirianni et al., 2002).

Variants candidats hétérozygotes (N=6)

De manière surprenante, seulement quatre variants homozygotes candidats ont été mis en évidence chez les dix patients consanguins mais six variants candidats hétérozygotes ont été retrouvés. Il sera nécessaire d'étudier l'héritabilité de ces variants hétérozygotes en les recherchant chez les parents des patients concernés : un caractère *de novo* en supporterait la pathogénicité. D'autre part, ces variants pourraient être hérités de la mère, chez qui ils n'auraient pas de conséquence phénotypique. Ces variants concernent les gènes *MAMLD1*, *DMRT2*, *GLI2*, *ZEB1*, *EPB41L4B* et *CTGF*.

Le gène *MAMLD1* a déjà été identifié comme responsable d'hypospadias (OMIM # 300758) (Fukami et al., 2006).

L'haploinsuffisance du gène *DMRT2* a été décrite comme potentiellement responsable d'anomalies du déterminisme sexuel (Muroya et al., 2000).

Le gène *GLI2*, pourrait être impliqué dans l'hypospadias à travers la voie Sonic Hedgehog (Miyagawa et al., 2011).

ZEB1 régule l'expression du récepteur aux androgènes dans un modèle de cellules humaines de prépuce (Qiao et al., 2012).

Dans un modèle cellulaire exprimant le récepteur humain aux androgènes, l'expression du gène *EPB41L4B* est induite par un traitement par dihydrotestostérone (Chauhan et al., 2003).

Le gène *CTGF* fait partie des gènes candidats pour l'hypospadias dans la littérature car son expression est augmentée dans les tissus provenant d'hypospadias. D'autre part, il est suggéré que l'exposition à l'estradiol entraînerait des hypospadias notamment par surexpression de *CTGF* (Willingham and Baskin, 2007; Zhou et al., 2009).

Variants de transmission dominante (N=12)

Enfin, le WES réalisé sur 10 duos a mis en évidence 12 variants candidats de transmission dominante dans les gènes *ARFGEF3*, *ZNF318*, *SOX8*, *WNT1*, *CYR61*, *ZFHX3*, *DEPP1*, *HERPUD1*, *EPB41L2*, *PER1*, *ZNF521* et *PELP1*.

Le gène *ARFGEF3* interagit avec PHB2, lui-même inhibiteur de la transcription du gène du récepteur aux œstrogènes. Une étude sur cellules de cancer du sein a montré que le gène *ARFGEF3* interférait avec cette inhibition et entraînait une élévation de la voie de signalisation du récepteur aux œstrogènes (Kim et al., 2009).

Le gène *ZNF318* code pour la protéine Tzf, qui en présence de son récepteur Tzf-L serait responsable d'une transactivation du récepteur aux androgènes dans un modèle cellulaire de cellules de cancer de la prostate (Tao et al., 2006).

Le gène *SOX8* est impliqué dans le spectre des anomalies de la différenciation sexuelle chez les sujets XY (Portnoi et al., 2018).

Le gène *WNT1* a été retenu puisque la voie Wnt est une voie candidate dans le développement des hypospadias (Bouty et al., 2015).

Le gène *CYR61* fait partie des 24 gènes surexprimés dans les tissus péniens chez les patients atteints d'hypospadias (Karabulut et al., 2013; Willingham and Baskin, 2007). De plus, il est surexprimé dans les explants myométriaux exposés au 17-bêta-estradiol (Sampath et al., 2001).

La transcription de *DEPP1* est induite par la progestérone de façon dose dépendante. L'expression de ce gène est également induite par les androgènes et légèrement induite par les œstrogènes (Watanabe et al., 2005).

Le gène *HERPUD1* est surexprimé chez les souris en réponse à Wnt1 ou la bêta-caténine. Toutefois cet effet n'est pas observé chez l'homme suggérant une régulation différente (Chtarbova et al., 2002).

Une étude sur cellules de cancer prostatiques a montré que *PER1* inhibait la transcription du récepteur aux androgènes, et que l'activation de ce récepteur exerçait un rétro contrôle positif sur *PER1* (Cao et al., 2009).

Chez la souris, l'inactivation d'*EPB41L2* à l'état homozygote est responsable d'une diminution du poids testiculaire avec anomalies des tubes séminifères, d'une absence de cellule de Sertoli et de cellules spermatogéniques immatures (Yang et al., 2011).

ZNF521 code pour une protéine qui, en réponse à BMP2 et BMP4, forme un complexe avec SMAD1 et SMAD4 (Bond et al., 2004). Ces quatre gènes interagissant avec *ZNF521* font tous partie de la pathogénèse de l'hypospadias (Willingham and Baskin, 2007).

Enfin, le gène *PELP1* est un coactivateur du récepteur aux œstrogènes (ESR1) et son promoteur est régulé positivement par ESR1 et ESR2 (Choi et al., 2004; Mishra et al., 2004; Vadlamudi et al., 2001).

V. Discussion générale

Les anomalies du développement sexuel, et l'hypospadias en particulier surtout quand il est sévère, sont des pathologies au sens médical du terme, même si les débats actuels ont tendance à les réduire à de simples variations par rapport à une norme qui ne considérerait que l'existence du genre féminin et du genre masculin. La première question que l'on pose à des parents qui viennent d'avoir un enfant est de savoir s'il s'agit d'une fille ou d'un garçon : ne pas pouvoir y répondre formellement constitue une souffrance indicible pour ces couples, souffrance qui ne pourra qu'être accentuée par les difficultés que connaîtra leur enfant pour trouver sa place dans la société, depuis l'école jusqu'à la puberté et à l'âge adulte où il voudra trouver son ou sa partenaire et désirer avoir des enfants.

La deuxième question qui suit la naissance d'un enfant atteint, question posée par les parents eux-mêmes, est celle du risque de récurrence et donc de l'origine génétique possible de l'anomalie génitale. Dès lors, il appartient aux médecins de tout faire pour déterminer la cause de cette dernière de façon à répondre à leur question, question qui peut empêcher ces couples de tenter une nouvelle grossesse.

Autant les anomalies dans la formation des gonades ont un déterminisme génétique fort, autant celles touchant la différenciation du tractus génital et celle des organes génitaux externes, dont fait partie l'hypospadias, mélangent causes génétiques, hormonales et environnementales ce qui rend particulièrement difficile la recherche de leur étiologie. Le contrôle hormonal de la différenciation sexuelle est en effet sensible au dérèglement de certains gènes impliqués dans la production de ces hormones ou dans leur réceptivité mais également à l'intervention de facteurs extérieurs faisant partie du groupe très vaste des perturbateurs endocriniens.

Le but de ce travail a donc été de rechercher de nouveaux mécanismes physiopathologiques impliqués dans la différenciation sexuelle et dans l'hypospadias en particulier en posant un certain nombre de questions qui n'avaient que peu ou pas été abordées précédemment :

- des mutations somatiques au niveau des organes génitaux dans des gènes sensibles peuvent-elles expliquer la genèse d'une malformation génitale ?
- existe-t-il dans ces malformations des anomalies chromosomiques de très petite taille détectables uniquement par les techniques de CGH-Array ?
- dans quelle mesure l'hCG sécrétée par le placenta peut-elle être responsable de la survenue d'une malformation génitale comme l'hypospadias ?
- les nouvelles techniques de séquençage de l'ADN permettent-elles de découvrir de nouveaux gènes responsables ?

L'originalité de ce projet de recherche fondamentale sur la physiopathologie génétique des hypospadias réside dans l'étude moléculaire comparative de trois tissus. Notre hypothèse initiale de comparaison des séquences germinales et somatiques n'a pas été vérifiée sur les 33 premiers patients. Cependant, cette étude a permis de constituer une cohorte prospective de patients indispensable pour de futures analyses en colligeant les données phénotypiques de façon normalisée et exhaustive et en réalisant une tissuthèque/DNAthèque. De plus, les mises au point, d'une part de l'extraction d'ADN issu de fibroblastes après culture de muqueuse préputiale et, dans une moindre mesure, de cellules urothéliales, et d'autre part du séquençage des gènes *AR*, *MAMLD1* et *NR5A1*, dont le rôle diagnostique et thérapeutique dans le spectre des DSD est essentiel, ont été réalisées et se sont avérées reproductibles. Malgré un faible effectif testé non stratifié selon le type d'hypospadias, les résultats sont encourageants puisque des variations non décrites ont été mises en évidence et que certains polymorphismes connus, en particulier pour le gène *AR*, ont une fréquence allélique significativement plus élevée dans notre cohorte. La poursuite de notre étude sur l'ensemble de la cohorte est nécessaire avant de conclure à l'absence de l'implication des mutations somatiques. Enfin, une étude plus large incluant des sujets témoins serait souhaitable pour analyser le rôle des polymorphismes identifiés dans la physiopathologie de l'hypospadias.

L'analyse pangénomique par puce à ADN de type SNP a permis de mettre en évidence des microremaniements chromosomiques. L'intérêt de cette analyse a été de se focaliser sur les cas d'hypospadias distaux isolés dont l'origine génétique est parfois décrite. Des duplications, des délétions et des régions d'homozygotie ont permis de mettre en évidence, chez des patients porteurs d'un hypospadias non

sévère, de nouveaux gènes candidats pouvant être impliqués dans la physiopathologie de l'hypospadias. Ce travail confirme l'intérêt de l'étude par puce SNP pour le diagnostic et la prise en charge des patients présentant un hypospadias. L'utilisation de ces nouveaux outils d'analyse génétique semble essentielle à la compréhension des mécanismes de survenue de cette pathologie malgré un conseil génétique qui peut s'avérer potentiellement difficile.

L'étude de l'association entre taux maternel d'hCG béta libre et la survenue d'un hypospadias a retrouvé une augmentation significative du taux de béta-hCG en cas de forme sévère [1,49 (0,62-5,8) pour les hypospadias proximaux (N=13) versus 0,92 (0,29-4,54) pour les formes distales (N=119), et 1,11 (0,35-5,35) pour les cas non spécifiés (N=38), $p=0,009$]. Cette association statistique reste significative après ajustement pour la dysfonction placentaire (prématurité, retard de croissance intra-utérin et petit poids de naissance) ($p=0,01$). Nos données valident l'hypothèse selon laquelle une altération du taux de béta-hCG maternel pourrait être associé à la survenue d'un hypospadias. Parce que notre cohorte inclut un nombre peu élevé d'enfants nés avec un hypospadias, d'autres études sont nécessaires et ces résultats préliminaires doivent être interprétés avec précaution. Cela illustre, d'une part, tout l'intérêt des registres populationnels de veille épidémiologique et des travaux collaboratifs qui peuvent exister entre urologues pédiatriques, généticiens et cytogénéticiens, endocrinologues et épidémiologistes, foetopathologistes et statisticiens. Et d'autre part, cela souligne la complexité de la physiopathologie de l'hypospadias : est-ce seulement une maladie génétique à part entière ? Ou alors plutôt un encombrement stérique entre environnement, dysfonction placentaire et perturbateurs endocriniens ? Ces derniers sont fortement pointés du doigt par la population générale et les médias. Ils sont surtout le reflet de leur action sur l'embryogenèse d'une part et sur l'action de l'Homme en général sur son environnement. Les études épidémiologiques montrent bien une augmentation importante des incidences de malformations congénitales, en particulier de l'appareil génito urinaire, mais aussi une augmentation de l'infertilité chez la population humaine en générale, et les adultes atteints d'hypospadias en particulier.

Enfin, l'analyse par Whole Exome Sequencing a permis d'identifier de nouveaux gènes candidats pouvant être impliqués dans le développement gonadique

et la différenciation du tractus génito-urinaire masculin. Cette étude souligne l'intérêt de l'utilisation des nouveaux outils d'analyse génétique pour comprendre les mécanismes de survenue de cette pathologie et la nécessité de plateforme de bio-informatique performante pour faire une analyse ciblée et non chronophage. Cependant le conseil génétique, dans un futur proche, va pouvoir s'avérer potentiellement difficile.

VI. Conclusion et perspectives

Le sujet de cette thèse était d'identifier de nouveaux mécanismes et de potentiels nouveaux gènes pouvant être impliqués dans la différenciation des organes génitaux externes masculins en partant de l'étude d'une cohorte de patients 46,XY DSD, en particulier porteurs d'un hypospadias isolé.

Nous avons, tout d'abord, infirmé l'hypothèse selon laquelle une mutation somatique pourrait être responsable du phénotype de ces patients. Même si l'analyse n'a concerné qu'un petit nombre de patients, il semblerait bien que les gènes *AR*, *MAMLD1* et *NR5A1* ne présentent pas de mutation au niveau des fibroblastes du prépuce. Cependant, nous pouvons nous demander si le tissu d'intérêt ne serait pas plutôt l'urothélium puisque l'hypospadias est avant tout un défaut urétral. Une prochaine étude pourrait être d'effectuer un frottis appuyé de la gouttière urétrale afin de rechercher des mutations somatiques sur ce tissu précis.

De plus, des polymorphismes décrits et non décrits ont été identifiés dans les trois premiers gènes candidats au niveau germlinal. En particulier, des variants du gène *AR* sembleraient significativement plus élevés dans notre cohorte. Ceci reste à confirmer par une analyse complète des 284 patients. Nous avons également mis en place lors de cette thèse un panel de gènes DSD regroupant 32 gènes que l'on pourrait tester pour l'ensemble de la cohorte.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence par une analyse pangénomique en puce SNP des microremaniements chromosomiques dans 15,7% des cas d'hypospadias distaux isolés non familiaux. Cela a permis d'identifier de nouveaux gènes candidats qui devront être analysés par séquençage selon Sanger.

De manière intéressante, l'analyse par Whole Exome Sequencing chez les patients présentant soit une consanguinité soit un hypospadias d'origine familiale avec une analyse en puce SNP normale a permis de mettre en évidence de nouveaux gènes candidats susceptibles d'être impliqués dans la physiopathologie de

l'hypospadias. Une étude plus précise et détaillée avec séquençage selon Sanger, étude fonctionnelle des gènes mutés pourrait être réalisée en collaboration avec l'équipe de Génétique Humaine du Dr. Mc Elreavey à l'Institut Pasteur, dont l'expertise est connue internationalement pour la construction de plasmides, la mutagenèse dirigée, la localisation cellulaire par microscopie confocale et l'étude d'expression des protéines mutantes.

L'analyse pangénomique en puce SNP et en WES laisse penser que les études génétiques dans le cadre des DSD ne devront plus s'intéresser uniquement aux exons. Des études par Whole Genome Sequencing pourraient permettre d'identifier des remaniements ou des mutations dans des régions régulatrices.

Enfin, l'association décrite entre un taux élevé de béta-hCG libre maternel et la survenue d'un hypospadias, particulièrement s'il est sévère et proximal, illustre la théorie selon laquelle l'hypospadias serait une « insensibilité partielle et idiopathique aux androgènes » et donc le résultat d'une hypovirilisation des organes génitaux externes par une insuffisance tissulaire androgéno-dépendante. Cependant, nous savons aussi que les mécanismes conduisant à la survenue d'un hypospadias ne sont surtout pas seulement d'origine génétique. L'apport de la recherche dans la compréhension des mécanismes épigénétiques semble essentiel. Et il ne faut pas oublier le rôle préjudiciable de l'environnement et des perturbateurs endocriniens sur l'expression des gènes de l'embryogenèse.

Ce travail de thèse confirme donc ainsi l'intérêt de l'étude génétique des patients porteurs d'un DSD ou d'un hypospadias isolé, même si le conseil génétique en cas de découverte d'anomalies lors du dépistage prénatal peut s'avérer difficile à interpréter et source d'angoisse pour les futurs parents.

VII. Bibliographie

- Adamovic, T., Thai, H.T.T., Liedén, A., and Nordenskjöld, A. (2013). Association of a tagging single nucleotide polymorphism in the androgen receptor gene region with susceptibility to severe hypospadias in a Caucasian population. *Sex Dev* 7, 173–179.
- Adzhubei, I., Jordan, D.M., and Sunyaev, S.R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet Chapter 7, Unit7.20*.
- Agopian, A.J., Hoang, T.T., Mitchell, L.E., Morrison, A.C., Tu, D., Nassar, N., and Canfield, M.A. (2016). Maternal hypertension and risk for hypospadias in offspring. *Am. J. Med. Genet. A* 170, 3125–3132.
- Akre, O., Lipworth, L., Cnattingius, S., Sparén, P., and Ekblom, A. (1999). Risk factor patterns for cryptorchidism and hypospadias. *Epidemiology* 10, 364–369.
- Andersson, M., Sjöström, S., Wängqvist, M., Örtqvist, L., Nordenskjöld, A., and Holmdahl, G. (2018). Psychosocial and Sexual Outcomes in Adolescents following Surgery for Proximal Hypospadias in Childhood. *J. Urol.* 200, 1362–1370.
- Andrieux, J. (2008). [Array-CGH for routine diagnosis of cryptic chromosomal imbalances]. *Pathol. Biol* 56, 368–374.
- Arboleda, V.A., Sandberg, D.E., and Vilain, E. (2014). DSDs: genetics, underlying pathologies and psychosexual differentiation. *Nat Rev Endocrinol* 10, 603–615.
- Arendt, L.H., Ramlau-Hansen, C.H., Wilcox, A.J., Henriksen, T.B., Olsen, J., and Lindhard, M.S. (2016). Placental Weight and Male Genital Anomalies: A Nationwide Danish Cohort Study. *Am. J. Epidemiol.* 183, 1122–1128.
- Arendt, L.H., Lindhard, M.S., Henriksen, T.B., Forman, A., Olsen, J., and Ramlau-Hansen, C.H. (2017a). Maternal endometriosis and genital malformations in boys: a Danish register-based study. *Fertil. Steril.* 108, 687–693.
- Arendt, L.H., Ramlau-Hansen, C.H., Lindhard, M.S., Henriksen, T.B., Olsen, J., Yu, Y., and Cnattingius, S. (2017b). Maternal Overweight and Obesity and Genital Anomalies in Male Offspring: A Population-Based Swedish Cohort Study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 31, 317–327.
- Arendt, L.H., Lindhard, M.S., Henriksen, T.B., Olsen, J., Cnattingius, S., Petersson, G., Parner, E.T., and Ramlau-Hansen, C.H. (2018a). Maternal Diabetes Mellitus and Genital Anomalies in Male Offspring: A Nationwide Cohort Study in 2 Nordic Countries. *Epidemiology* 29, 280–289.

Arendt, L.H., Henriksen, T.B., Lindhard, M.S., Parner, E.T., Olsen, J., and Ramlau-Hansen, C.H. (2018b). Hypertensive Disorders of Pregnancy and Genital Anomalies in Boys: A Danish Nationwide Cohort Study. *Epidemiology* 29, 739–748.

Aschim, E.L., Nordenskjöld, A., Giwercman, A., Lundin, K.B., Ruhayel, Y., Haugen, T.B., Grotmol, T., and Giwercman, Y.L. (2004a). Linkage between cryptorchidism, hypospadias, and GGN repeat length in the androgen receptor gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89, 5105–5109.

Aschim, E.L., Haugen, T.B., Tretli, S., Daltveit, A.K., and Grotmol, T. (2004b). Risk factors for hypospadias in Norwegian boys - association with testicular dysgenesis syndrome? *Int. J. Androl.* 27, 213–221.

Aschim, E.L., Giwercman, A., Ståhl, O., Eberhard, J., Cwikiel, M., Nordenskjöld, A., Haugen, T.B., Grotmol, T., and Giwercman, Y.L. (2005). The RsaI polymorphism in the estrogen receptor-beta gene is associated with male infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 5343–5348.

ATC (2000). *Guide des Techniques de Cytogénétique* (Lille, France).

Auchus, R.J., and Miller, W.L. (2012). Defects in androgen biosynthesis causing 46,XY disorders of sexual development. *Semin. Reprod. Med.* 30, 417–426.

Baetens, D., Mendonça, B.B., Verdin, H., Cools, M., and De Baere, E. (2017). Non-coding variation in disorders of sex development. *Clin. Genet.* 91, 163–172.

Baetens, D., Verdin, H., De Baere, E., and Cools, M. (2019). Update on the genetics of differences of sex development (DSD). *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 33, 101271.

Ball, E.V., Stenson, P.D., Abeysinghe, S.S., Krawczak, M., Cooper, D.N., and Chuzhanova, N.A. (2005). Microdeletions and microinsertions causing human genetic disease: common mechanisms of mutagenesis and the role of local DNA sequence complexity. *Hum. Mutat.* 26, 205–213.

Ban, S., Sata, F., Kurahashi, N., Kasai, S., Moriya, K., Kakizaki, H., Nonomura, K., and Kishi, R. (2008). Genetic polymorphisms of ESR1 and ESR2 that may influence estrogen activity and the risk of hypospadias. *Hum. Reprod* 23, 1466–1471.

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.

Bashamboo, A., Ferraz-de-Souza, B., Lourenço, D., Lin, L., Sebire, N.J., Montjean, D., Bignon-Topalovic, J., Mandelbaum, J., Siffroi, J.-P., Christin-Maitre, S., et al. (2010). Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. *Am. J. Hum. Genet* 87, 505–512.

Beilin, J., Ball, E.M., Favaloro, J.M., and Zajac, J.D. (2000). Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 85–96.

Beleza-Meireles, A., Lundberg, F., Lagerstedt, K., Zhou, X., Omrani, D., Frisé, L., and Nordenskjöld, A. (2007a). FGFR2, FGF8, FGF10 and BMP7 as candidate genes for hypospadias. *Eur. J. Hum. Genet* 15, 405–410.

Beleza-Meireles, A., Kockum, I., Lundberg, F., Söderhäll, C., and Nordenskjöld, A. (2007b). Risk factors for hypospadias in the estrogen receptor 2 gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 92, 3712–3718.

Beleza-Meireles, A., Barbaro, M., Wedell, A., Töhönen, V., and Nordenskjöld, A. (2007c). Studies of a co-chaperone of the androgen receptor, FKBP52, as candidate for hypospadias. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 5, 8.

Beleza-Meireles, A., Töhönen, V., Söderhäll, C., Schwentner, C., Radmayr, C., Kockum, I., and Nordenskjöld, A. (2008). Activating transcription factor 3: a hormone responsive gene in the etiology of hypospadias. *Eur. J. Endocrinol* 158, 729–739.

Bernstein, L., Pike, M.C., Depue, R.H., Ross, R.K., Moore, J.W., and Henderson, B.E. (1988). Maternal hormone levels in early gestation of cryptorchid males: a case-control study. *Br. J. Cancer* 58, 379–381.

Berta, P., Hawkins, J.R., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N., and Fellous, M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348, 448–450.

Biason-Lauber, A., Konrad, D., Navratil, F., and Schoenle, E.J. (2004). A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N. Engl. J. Med.* 351, 792–798.

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.

Biggs, M.L., Baer, A., and Critchlow, C.W. (2002). Maternal, delivery, and perinatal characteristics associated with cryptorchidism: a population-based case-control study among births in Washington State. *Epidemiology* 13, 197–204.

Blanc, T., Ayedi, A., El-Ghoneimi, A., Abdoul, H., Aigrain, Y., Paris, F., Sultan, C., Carel, J.-C., and Léger, J. (2011). Testicular function and physical outcome in young adult males diagnosed with idiopathic 46 XY disorders of sex development during childhood. *Eur. J. Endocrinol.* 165, 907–915.

Blaschko, S.D., Cunha, G.R., and Baskin, L.S. (2012). Molecular mechanisms of external genitalia development. *Differentiation* 84, 261–268.

Blotière, P.-O., Raguideau, F., Weill, A., Elefant, E., Perthuis, I., Goulet, V., Rouget, F., Zureik, M., Coste, J., and Dray-Spira, R. (2019). Risks of 23 specific malformations associated with prenatal exposure to 10 antiepileptic drugs. *Neurology* 93, e167–e180.

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.

Boisen, K.A., Chellakooty, M., Schmidt, I.M., Kai, C.M., Damgaard, I.N., Suomi, A.-M., Toppari, J., Skakkebaek, N.E., and Main, K.M. (2005). Hypospadias in a cohort of 1072 Danish newborn boys: prevalence and relationship to placental weight, anthropometrical measurements at birth, and reproductive hormone levels at three months of age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 4041–4046.

Bond, H.M., Mesuraca, M., Carbone, E., Bonelli, P., Agosti, V., Amodio, N., De Rosa, G., Di Nicola, M., Gianni, A.M., Moore, M.A.S., et al. (2004). Early hematopoietic zinc finger protein (EHZF), the human homolog to mouse Evi3, is highly expressed in primitive human hematopoietic cells. *Blood* 103, 2062–2070.

Borhani, N., Ghaffari Novin, M., Manoochehri, M., Rouzrokh, M., Kazemi, B., Koochaki, A., Hosseini, A., Masteri Farahani, R., and Omrani, M.D. (2014). New single nucleotide variation in the promoter region of androgen receptor (AR) gene in hypospadiac patients. *Iran J Reprod Med* 12, 217–220.

Botta, S., Cunha, G.R., and Baskin, L.S. (2014). Do endocrine disruptors cause hypospadias? *Transl Androl Urol* 3, 330–339.

Boulanger, L., Pannetier, M., Gall, L., Allais-Bonnet, A., Elzaiat, M., Le Bourhis, D., Daniel, N., Richard, C., Cotinot, C., Ghyselincq, N.B., et al. (2014). FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. *Curr. Biol.* 24, 404–408.

Bouty, A., Ayers, K.L., Pask, A., Heloury, Y., and Sinclair, A.H. (2015). The Genetic and Environmental Factors Underlying Hypospadias. *Sex Dev* 9, 239–259.

Bouvattier, C., and Chatelain, P. (2008). [Congenital adrenal hyperplasia]. *Rev Prat* 58, 990–994.

Brandão, M.P., Costa, E.M.F., Fukami, M., Gerdulo, M., Pereira, N.P., Domenice, S., Ogata, T., and Mendonca, B.B. (2011). MAMLD1 (Mastermind-Like Domain Containing 1) Homozygous Gain-of-Function Missense Mutation Causing 46,XX Disorder of Sex Development in a Virilized Female. *Adv. Exp. Med. Biol* 707, 129–131.

Brouwers, M.M., van der Zanden, L.F.M., de Gier, R.P.E., Barten, E.J., Zielhuis, G.A., Feitz, W.F.J., and Roeleveld, N. (2010). Hypospadias: risk factor patterns and different phenotypes. *BJU Int* 105, 254–262.

Bullejos, M., and Koopman, P. (2001). Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Dev. Dyn.* 221, 201–205.

Burton, M.H., Davies, T.W., and Raggatt, P.R. (1987). Undescended testis and hormone levels in early pregnancy. *J Epidemiol Community Health* 41, 127–129.

Buur, L.E., Laurberg, V.R., Ernst, A., Arendt, L.H., Nybo Andersen, A.-M., Olsen, J., and Ramlau-Hansen, C.H. (2019). Oral contraceptive use and genital anomalies in sons. A Danish cohort study. *Reprod. Toxicol.* 89, 67–73.

Camats, N., Pandey, A.V., Fernández-Cancio, M., Andaluz, P., Janner, M., Torán, N., Moreno, F., Bereket, A., Akcay, T., García-García, E., et al. (2012). Ten novel mutations in the NR5A1 gene cause disordered sex development in 46,XY and ovarian insufficiency in 46,XX individuals. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E1294-1306.

Cao, Q., Gery, S., Dashti, A., Yin, D., Zhou, Y., Gu, J., and Koeffler, H.P. (2009). A role for the clock gene *per1* in prostate cancer. *Cancer Res.* 69, 7619–7625.

Carmichael, S.L., Shaw, G.M., Laurent, C., Olney, R.S., Lammer, E.J., and National Birth Defects Prevention Study (2007). Maternal reproductive and demographic characteristics as risk factors for hypospadias. *Paediatr Perinat Epidemiol* 21, 210–218.

Carmichael, S.L., Shaw, G.M., and Lammer, E.J. (2012). Environmental and genetic contributors to hypospadias: a review of the epidemiologic evidence. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 94, 499–510.

Carmichael, S.L., Yang, W., Roberts, E.M., Kegley, S.E., Wolff, C., Guo, L., Lammer, E.J., English, P., and Shaw, G.M. (2013a). Hypospadias and residential proximity to pesticide applications. *Pediatrics* 132, e1216-1226.

Carmichael, S.L., Cogswell, M.E., Ma, C., Gonzalez-Feliciano, A., Olney, R.S., Correa, A., Shaw, G.M., and National Birth Defects Prevention Study (2013b). Hypospadias and maternal intake of phytoestrogens. *Am. J. Epidemiol.* 178, 434–440.

Carmichael, S.L., Mohammed, N., Ma, C., Iovannisci, D., Choudhry, S., Baskin, L.S., Witte, J.S., Shaw, G.M., and Lammer, E.J. (2013c). Diacylglycerol kinase K variants impact hypospadias in a California study population. *J. Urol.* 189, 305–311.

Carmichael, S.L., Ma, C., Choudhry, S., Lammer, E.J., Witte, J.S., and Shaw, G.M. (2013d). Hypospadias and genes related to genital tubercle and early urethral development. *J. Urol.* 190, 1884–1892.

Carmichael, S.L., Witte, J.S., Ma, C., Lammer, E.J., and Shaw, G.M. (2014). Hypospadias and variants in genes related to sex hormone biosynthesis and metabolism. *Andrology* 2, 130–137.

Carmichael, S.L., Ma, C., Shaw, G.M., and National Birth Defects Prevention Study (2017). Maternal Smoking, Alcohol, and Caffeine Exposures and Risk of Hypospadias. *Birth Defects Res* 109, 1127–1133.

- Castagnetti, M., and El-Ghoneimi, A. (2010). Surgical management of primary severe hypospadias in children: systematic 20-year review. *J. Urol.* *184*, 1469–1474.
- Castagnetti, M., and El-Ghoneimi, A. (2011). The influence of perioperative factors on primary severe hypospadias repair. *Nat Rev Urol* *8*, 198–206.
- Catti, M., Lottmann, H., Babloyan, S., Lortat-Jacob, S., and Mouriquand, P. (2009). Original Koyanagi urethroplasty versus modified Hayashi technique: outcome in 57 patients. *J Pediatr Urol* *5*, 300–306.
- Cavoretto, P., Giorgione, V., Cipriani, S., Viganò, P., Candiani, M., Inversetti, A., Ricci, E., and Parazzini, F. (2017). Nuchal translucency measurement, free β -hCG and PAPP-A concentrations in IVF/ICSI pregnancies: systematic review and meta-analysis. *Prenat. Diagn.* *37*, 540–555.
- Chamberlain, N.L., Driver, E.D., and Miesfeld, R.L. (1994). The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res.* *22*, 3181–3186.
- 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. *Development* *139*, 4461–4472.
- Chauhan, S., Pandey, R., Way, J.F., Sroka, T.C., Demetriou, M.C., Kunz, S., Cress, A.E., Mount, D.W., and Miesfeld, R.L. (2003). Androgen regulation of the human FERM domain encoding gene EHM2 in a cell model of steroid-induced differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *310*, 421–432.
- Chedane, C., Puissant, H., Weil, D., Rouleau, S., and Coutant, R. (2014). Association between altered placental human chorionic gonadotrophin (hCG) production and the occurrence of cryptorchidism: a retrospective study. *BMC Pediatr* *14*, 191.
- Chen, J.-M., Cooper, D.N., and Férec, C. (2012). Local sequence determinants of two in-frame triplet deletion/duplication hotspots in the RHD/RHCE genes. *Hum. Genomics* *6*, 8.
- Chen, M.-J., Macias, C.G., Gunn, S.K., Dietrich, J.E., Roth, D.R., Schlomer, B.J., and Karaviti, L.P. (2014). Intrauterine growth restriction and hypospadias: is there a connection? *Int J Pediatr Endocrinol* *2014*, 20.
- Chen, T., Li, Q., Xu, J., Ding, K., Wang, Y., Wang, W., Li, S., and Shen, Y. (2007). Mutation screening of BMP4, BMP7, HOXA4 and HOXB6 genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur. J. Hum. Genet* *15*, 23–28.
- Chen, Y., Thai, H.T.T., Lundin, J., Lagerstedt-Robinson, K., Zhao, S., Markljung, E., and Nordenskjöld, A. (2010). Mutational study of the MAMLD1-gene in hypospadias. *Eur J Med Genet* *53*, 122–126.
- Chen, Y., Huang, J., and Mei, J. (2019). A risk prediction model for fetal hypospadias by testing maternal serum AFP and free beta-HCG. *Clin. Biochem.* *69*, 21–25.

Choi, Y.B., Ko, J.K., and Shin, J. (2004). The transcriptional corepressor, PELP1, recruits HDAC2 and masks histones using two separate domains. *J. Biol. Chem.* 279, 50930–50941.

Choudhry, S., Baskin, L.S., Lammer, E.J., Witte, J.S., Dasgupta, S., Ma, C., Surampalli, A., Shen, J., Shaw, G.M., and Carmichael, S.L. (2015). Genetic polymorphisms in ESR1 and ESR2 genes, and risk of hypospadias in a multiethnic study population. *J. Urol.* 193, 1625–1631.

Chtarbova, S., Nimmrich, I., Erdmann, S., Herter, P., Renner, M., Kitajewski, J., and Müller, O. (2002). Murine Nr4a1 and Herpud1 are up-regulated by Wnt-1, but the homologous human genes are independent from beta-catenin activation. *Biochem. J.* 367, 723–728.

Cognez, N., Warembourg, C., Zaros, C., Metten, M.-A., Bouvier, G., Garlantézec, R., Charles, M.-A., Béranger, R., and Chevrier, C. (2019). Residential sources of pesticide exposure during pregnancy and the risks of hypospadias and cryptorchidism: the French ELFE birth cohort. *Occup Environ Med* 76, 672–679.

Collège national des enseignants et praticiens de génétique médicale (France) (2004). *Génétique médicale : formelle, chromosomique, moléculaire, clinique* (Paris: Masson).

Costa, E.M.F., Domenice, S., Sircili, M.H., Inacio, M., and Mendonca, B.B. (2012). DSD due to 5 α -reductase 2 deficiency - from diagnosis to long term outcome. *Semin. Reprod. Med.* 30, 427–431.

Crabbe, P., Bogaert, V., De Bacquer, D., Goemaere, S., Zmierzak, H., and Kaufman, J.M. (2007). Part of the interindividual variation in serum testosterone levels in healthy men reflects differences in androgen sensitivity and feedback set point: contribution of the androgen receptor polyglutamine tract polymorphism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3604–3610.

Croft, B., Ohnesorg, T., Hewitt, J., Bowles, J., Quinn, A., Tan, J., Corbin, V., Pelosi, E., van den Bergen, J., Sreenivasan, R., et al. (2018). Human sex reversal is caused by duplication or deletion of core enhancers upstream of SOX9. *Nat Commun* 9, 5319.

Czeizel, A., Tóth, J., and Erodi, E. (1979). Aetiological studies of hypospadias in Hungary. *Hum. Hered.* 29, 166–171.

DeFalco, T., Takahashi, S., and Capel, B. (2011). Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Developmental Biology* 352, 14–26.

Dong, X.-Y., Sun, X., Guo, P., Li, Q., Sasahara, M., Ishii, Y., and Dong, J.-T. (2010). ATBF1 inhibits estrogen receptor (ER) function by selectively competing with AIB1 for binding to the ER in ER-positive breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 285, 32801–32809.

van den Driesche, S., Kilcoyne, K.R., Wagner, I., Rebourcet, D., Boyle, A., Mitchell, R., McKinnell, C., Macpherson, S., Donat, R., Shukla, C.J., et al. (2017). Experimentally induced testicular dysgenesis syndrome originates in the masculinization programming window. *JCI Insight* 2, e91204.

Duggavathi, R., Volle, D.H., Matak, C., Antal, M.C., Messaddeq, N., Auwerx, J., Murphy, B.D., and Schoonjans, K. (2008). Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. *Genes Dev.* 22, 1871–1876.

Eggers, S., and Sinclair, A. (2012). Mammalian sex determination—insights from humans and mice. *Chromosome Res.* 20, 215–238.

Encha-Razavi, F., and Escudier, E. (2008). *Embryologie humaine* (Masson).

Erickson, R.P. (2010). Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. *Mutat. Res* 705, 96–106.

Estors Sastre, B., Campillo Artero, C., González Ruiz, Y., Fernández Atuan, R.L., Bragagnini Rodríguez, P., Frontera Juan, G., and Gracia Romero, J. (2019). Occupational exposure to endocrine-disrupting chemicals and other parental risk factors in hypospadias and cryptorchidism development: a case-control study. *J Pediatr Urol.*

Ezaki, J., Hashimoto, K., Asano, T., Kanda, S., Akioka, Y., Hattori, M., Yamamoto, T., and Shibata, N. (2015). Gonadal tumor in Frasier syndrome: a review and classification. *Cancer Prev Res (Phila)* 8, 271–276.

Faber, P.W., Kuiper, G.G., van Rooij, H.C., van der Korput, J.A., Brinkmann, A.O., and Trapman, J. (1989). The N-terminal domain of the human androgen receptor is encoded by one, large exon. *Mol. Cell. Endocrinol.* 61, 257–262.

Fénichel, P., Brucker-Davis, F., and Chevalier, N. (2015). The history of Distilbène® (Diethylstilbestrol) told to grandchildren--the transgenerational effect. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 76, 253–259.

Ferraz-de-Souza, B., Lin, L., and Achermann, J.C. (2011). Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. *Mol. Cell. Endocrinol* 336, 198–205.

Fisher, J.S., Macpherson, S., Marchetti, N., and Sharpe, R.M. (2003). Human “testicular dysgenesis syndrome”: a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum. Reprod.* 18, 1383–1394.

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.

Fournier, T., Guibourdenche, J., and Evain-Brion, D. (2015). Review: hCGs: different sources of production, different glycoforms and functions. *Placenta* 36 Suppl 1, S60-65.

- Fowler, P.A., Bhattacharya, S., Gromoll, J., Monteiro, A., and O'Shaughnessy, P.J. (2009). Maternal smoking and developmental changes in luteinizing hormone (LH) and the LH receptor in the fetal testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 4688–4695.
- Fredell, L., Iselius, L., Collins, A., Hansson, E., Holmner, S., Lundquist, L., Läckgren, G., Pedersen, J., Stenberg, A., Westbacke, G., et al. (2002). Complex segregation analysis of hypospadias. *Hum. Genet* *111*, 231–234.
- Fujimoto, T., Suwa, T., Kabe, K., Adachi, T., Nakabayashi, M., and Amamiya, T. (2008). Placental insufficiency in early gestation is associated with hypospadias. *J. Pediatr. Surg.* *43*, 358–361.
- Fukami, M., Wada, Y., Miyabayashi, K., Nishino, I., Hasegawa, T., Nordenskjöld, A., Camerino, G., Kretz, C., Buj-Bello, A., Laporte, J., et al. (2006). *CXorf6* is a causative gene for hypospadias. *Nat. Genet* *38*, 1369–1371.
- Fukami, M., Wada, Y., Okada, M., Kato, F., Katsumata, N., Baba, T., Morohashi, K., Laporte, J., Kitagawa, M., and Ogata, T. (2008). Mastermind-like domain-containing 1 (MAMLD1 or *CXorf6*) transactivates the *Hes3* promoter, augments testosterone production, and contains the SF1 target sequence. *J. Biol. Chem* *283*, 5525–5532.
- Gao, T., Marcelli, M., and McPhaul, M.J. (1996). Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol* *59*, 9–20.
- Gaspari, L., Paris, F., Philibert, P., Audran, F., Orsini, M., Servant, N., Maïmoun, L., Kalfa, N., and Sultan, C. (2011). “Idiopathic” partial androgen insensitivity syndrome in 28 newborn and infant males: impact of prenatal exposure to environmental endocrine-disruptor chemicals? *Eur J Endocrinol.*
- Gatti, J.M., Kirsch, A.J., Troyer, W.A., Perez-Brayfield, M.R., Smith, E.A., and Scherz, H.C. (2001). Increased incidence of hypospadias in small-for-gestational age infants in a neonatal intensive-care unit. *BJU Int.* *87*, 548–550.
- Geller, F., Feenstra, B., Carstensen, L., Pers, T.H., van Rooij, I.A.L.M., Körberg, I.B., Choudhry, S., Karjalainen, J.M., Schnack, T.H., Hollegaard, M.V., et al. (2014). Genome-wide association analyses identify variants in developmental genes associated with hypospadias. *Nat. Genet.* *46*, 957–963.
- George, M., Schneuer, F.J., Jamieson, S.E., and Holland, A.J.A. (2015). Genetic and environmental factors in the aetiology of hypospadias. *Pediatr. Surg. Int.* *31*, 519–527.
- Ghazarian, A.A., Trabert, B., Graubard, B.I., Longnecker, M.P., Klebanoff, M.A., and McGlynn, K.A. (2018). Placental Weight and Risk of Cryptorchidism and Hypospadias in the Collaborative Perinatal Project. *Am. J. Epidemiol.* *187*, 1354–1361.
- Gnrke, A., Melnikov, A., Maguire, J., Rogov, P., LeProust, E.M., Brockman, W., Fennell, T., Giannoukos, G., Fisher, S., Russ, C., et al. (2009). Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat. Biotechnol.* *27*, 182–189.

Gonen, N., and Lovell-Badge, R. (2019). The regulation of Sox9 expression in the gonad. *Curr. Top. Dev. Biol.* 134, 223–252.

Gorduza, D.B., Gay, C.-L., de Mattos E Silva, E., Demède, D., Hameury, F., Berthiller, J., Mure, P.-Y., and Mouriquand, P.D. (2011). Does androgen stimulation prior to hypospadias surgery increase the rate of healing complications? - A preliminary report. *J Pediatr Urol* 7, 158–161.

Gottlieb, B., Beitel, L.K., Nadarajah, A., Paliouras, M., and Trifiro, M. (2012). The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum. Mutat.* 33, 887–894.

Govers, L.C., Harper, A.P., Finger, B.J., Mattiske, D.M., Pask, A.J., and Green, M.P. (2019a). Atrazine induces penis abnormalities including hypospadias in mice. *J Dev Orig Health Dis* 1–4.

Govers, L.C., Phillips, T.R., Mattiske, D.M., Rashoo, N., Black, J.R., Sinclair, A., Baskin, L.S., Risbridger, G.P., and Pask, A.J. (2019b). A critical role for estrogen signaling in penis development. *FASEB J.* fj201802586RR.

Greenhill, C. (2014). Development: Hypospadias linked with maternal hypertension. *Nat Rev Endocrinol* 10, 189.

Grosos, C., Bensaid, R., Gorduza, D.-B., and Mouriquand, P. (2014). Is it safe to solely use ventral penile tissues in hypospadias repair? Long-term outcomes of 578 Duplay urethroplasties performed in a single institution over a period of 14 years. *J Pediatr Urol* 10, 1232–1237.

Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1995). Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121, 1603–1614.

Hadidi, A., and Azmy, A.F. (2011). *Hypospadias Surgery: An Illustrated Guide* (Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K).

Hammouda, H.M., El-Ghoneimi, A., Bagli, D.J., McLorie, G.A., and Khoury, A.E. (2003). Tubularized incised plate repair: functional outcome after intermediate followup. *J. Urol.* 169, 331–333; discussion 333.

Hao, Y., Montiel, R., Li, B., Huang, E., Zeng, L., and Huang, Y. (2010). Association between androgen receptor gene CAG repeat polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* 124, 815–820.

Haraux, E., Braun, K., Buisson, P., Stéphan-Blanchard, E., Devauchelle, C., Ricard, J., Boudailliez, B., Tourneux, P., Gouron, R., and Chardon, K. (2016). Maternal Exposure to Domestic Hair Cosmetics and Occupational Endocrine Disruptors Is Associated with a Higher Risk of Hypospadias in the Offspring. *Int J Environ Res Public Health* 14.

Haraux, E., Tourneux, P., Kouakam, C., Stephan-Blanchard, E., Boudailliez, B., Leke, A., Klein, C., and Chardon, K. (2018). Isolated hypospadias: The impact of prenatal exposure to pesticides, as determined by meconium analysis. *Environ Int* 119, 20–25.

Hardy, D.O., Scher, H.I., Bogenreider, T., Sabbatini, P., Zhang, Z.F., Nanus, D.M., and Catterall, J.F. (1996). Androgen receptor CAG repeat lengths in prostate cancer: correlation with age of onset. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *81*, 4400–4405.

Hashimoto, Y., Kawai, M., Nagai, S., Matsukura, T., Niwa, F., Hasegawa, T., and Heike, T. (2016). Fetal growth restriction but not preterm birth is a risk factor for severe hypospadias. *Pediatr Int* *58*, 573–577.

Hiort, O., Wodtke, A., Struve, D., Zöllner, A., and Sinnecker, G.H. (1994). Detection of point mutations in the androgen receptor gene using non-isotopic single strand conformation polymorphism analysis. German Collaborative Intersex Study Group. *Hum. Mol. Genet.* *3*, 1163–1166.

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.

Huang, S., Ye, L., and Chen, H. (2017). Sex determination and maintenance: the role of DMRT1 and FOXL2. *Asian J. Androl.* *19*, 619–624.

Hueber, P.-A., Antczak, C., Abdo, A., Franc-Guimond, J., Barrieras, D., and Houle, A.-M. (2015). Long-term functional outcomes of distal hypospadias repair: a single center retrospective comparative study of TIPs, Mathieu and MAGPI. *J Pediatr Urol* *11*, 68.e1-7.

Hughes, I.A., and Acerini, C.L. (2008). Factors controlling testis descent. *Eur. J. Endocrinol.* *159 Suppl 1*, S75-82.

Hughes, I.A., Werner, R., Bunch, T., and Hiort, O. (2012a). Androgen insensitivity syndrome. *Semin. Reprod. Med.* *30*, 432–442.

Hughes, I.A., Morel, Y., McElreavey, K., and Rogol, A. (2012b). Biological assessment of abnormal genitalia. *J Pediatr Urol* *8*, 592–596.

Hughes, I.A., Davies, J.D., Bunch, T.I., Pasterski, V., Mastroyannopoulou, K., and MacDougall, J. (2012c). Androgen insensitivity syndrome. *Lancet* *380*, 1419–1428.

Hugon (2010). Analyse de neuf patientes avec une insuffisance ovarienne prématurée et une translocation X_autosome par puces à ADN pangénomiques de type SNP (Single Nucleotid Polymorphism). Université Paris V - René Diderot.

Huisma, F., Thomas, M., and Armstrong, L. (2013). Severe hypospadias and its association with maternal-placental factors. *Am. J. Med. Genet. A* *161A*, 2183–2187.

lafrate, A.J., Feuk, L., Rivera, M.N., Listewnik, M.L., Donahoe, P.K., Qi, Y., Scherer, S.W., and Lee, C. (2004). Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat. Genet.* *36*, 949–951.

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.* *10*, 1261–1272.

Illumina Inc. Infinium HD Assay Gemini Protocol Guide.

Interrante, J.D., Ailes, E.C., Lind, J.N., Anderka, M., Feldkamp, M.L., Werler, M.M., Taylor, L.G., Trinidad, J., Gilboa, S.M., Broussard, C.S., et al. (2017). Risk comparison for prenatal use of analgesics and selected birth defects, National Birth Defects Prevention Study 1997-2011. *Ann Epidemiol* 27, 645-653.e2.

Ishii, T., Sato, S., Kosaki, K., Sasaki, G., Muroya, K., Ogata, T., and Matsuo, N. (2001). Micropenis and the AR Gene: mutation and CAG repeat-length analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 5372–5378.

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.

Josso, N., Belville, C., di Clemente, N., and Picard, J.-Y. (2005). AMH and AMH receptor defects in persistent Müllerian duct syndrome. *Hum. Reprod. Update* 11, 351–356.

Jost, A. (1991). *Les péripéties d'une recherche: l'étude de la différenciation sexuelle.*

Kalfa, N., Liu, B., Klein, O., Ophir, K., Audran, F., Wang, M.-H., Mei, C., Sultan, C., and Baskin, L.S. (2008). Mutations of CXorf6 are associated with a range of severities of hypospadias. *Eur. J. Endocrinol* 159, 453–458.

Kalfa, N., Philibert, P., and Sultan, C. (2009a). Is hypospadias a genetic, endocrine or environmental disease, or still an unexplained malformation? *Int. J. Androl* 32, 187–197.

Kalfa, N., Philibert, P., and Sultan, C. (2009b). [Hypospadias and genetics]. *Arch Pediatr* 16, 951–953.

Kalfa, N., Paris, F., Soyer-Gobillard, M.-O., Daures, J.-P., and Sultan, C. (2011a). Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. *Fertil. Steril* 95, 2574–2577.

Kalfa, N., Philibert, P., Baskin, L.S., and Sultan, C. (2011b). Hypospadias: interactions between environment and genetics. *Mol. Cell. Endocrinol* 335, 89–95.

Kalfa, N., Philibert, P., Werner, R., Audran, F., Bashamboo, A., Lehors, H., Haddad, M., Guys, J.M., Reynaud, R., Alessandrini, P., et al. (2013). Minor hypospadias: the “tip of the iceberg” of the partial androgen insensitivity syndrome. *PLoS ONE* 8, e61824.

Kalfa, N., Paris, F., Philibert, P., Orsini, M., Broussous, S., Fauconnet-Servant, N., Audran, F., Gaspari, L., Lehors, H., Haddad, M., et al. (2015). Is Hypospadias Associated with Prenatal Exposure to Endocrine Disruptors? A French Collaborative Controlled Study of a Cohort of 300 Consecutive Children Without Genetic Defect. *Eur. Urol.* 68, 1023–1030.

- Karabulut, R., Turkyilmaz, Z., Sonmez, K., Kumas, G., Ergun, S., Ergun, M., and Basaklar, A. (2013). Twenty-Four Genes are Upregulated in Patients with Hypospadias. *Balkan J. Med. Genet.* 16, 39–44.
- Karl, J., and Capel, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev. Biol.* 203, 323–333.
- 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.
- Kazemi-Esfarjani, P., Trifiro, M.A., and Pinsky, L. (1995). Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)*n*-expanded neuronopathies. *Hum. Mol. Genet.* 4, 523–527.
- Keren, B. (2008). Utilisation des puces SNP dans le diagnostic des réarrangements chromosomiques chez des patients atteints de retard mental. Mémoire de D.E.S.C. de cytogénétique humaine.
- Kiely, E.A., Chapman, R.S., Bajoria, S.K., Hollyer, J.S., and Hurley, R. (1995). Maternal serum human chorionic gonadotrophin during early pregnancy resulting in boys with hypospadias or cryptorchidism. *Br J Urol* 76, 389–392.
- Kilcoyne, K.R., and Mitchell, R.T. (2017). Assessing the impact of in-utero exposures: potential effects of paracetamol on male reproductive development. *Arch. Dis. Child.* 102, 1169–1175.
- Kim, J.-W., Akiyama, M., Park, J.-H., Lin, M.-L., Shimo, A., Ueki, T., Daigo, Y., Tsunoda, T., Nishidate, T., Nakamura, Y., et al. (2009). Activation of an estrogen/estrogen receptor signaling by BIG3 through its inhibitory effect on nuclear transport of PHB2/REA in breast cancer. *Cancer Sci.* 100, 1468–1478.
- Kim, K.S., Liu, W., Cunha, G.R., Russell, D.W., Huang, H., Shapiro, E., and Baskin, L.S. (2002). Expression of the androgen receptor and 5 alpha-reductase type 2 in the developing human fetal penis and urethra. *Cell Tissue Res.* 307, 145–153.
- 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.
- Klip, H., Verloop, J., van Gool, J.D., Koster, M.E.T.A., Burger, C.W., van Leeuwen, F.E., and OMEGA Project Group (2002). Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet* 359, 1102–1107.

Klonisch, T., Fowler, P.A., and Hombach-Klonisch, S. (2004). Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Dev. Biol* 270, 1–18.

Knower, K.C., Kelly, S., Ludbrook, L.M., Bagheri-Fam, S., Sim, H., Bernard, P., Sekido, R., Lovell-Badge, R., and Harley, V.R. (2011). Failure of SOX9 regulation in 46XY disorders of sex development with SRY, SOX9 and SF1 mutations. *PLoS ONE* 6, e17751.

Köhler, B., Schumacher, V., Schulte-Overberg, U., Biewald, W., Lennert, T., l'Allemand, D., Royer-Pokora, B., and Grüters, A. (1999). Bilateral Wilms tumor in a boy with severe hypospadias and cryptorchidism due to a heterozygous mutation in the WT1 gene. *Pediatr. Res.* 45, 187–190.

Köhler, B., Lin, L., Mazen, I., Cetindag, C., Biebermann, H., Akkurt, I., Rossi, R., Hiort, O., Grüters, A., and Achermann, J.C. (2009). The spectrum of phenotypes associated with mutations in steroidogenic factor 1 (SF-1, NR5A1, Ad4BP) includes severe penoscrotal hypospadias in 46,XY males without adrenal insufficiency. *Eur. J. Endocrinol* 161, 237–242.

Köhler, B., Biebermann, H., Friedsam, V., Gellermann, J., Maier, R.F., Pohl, M., Wieacker, P., Hiort, O., Grüters, A., and Krude, H. (2011). Analysis of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in patients 46,XY disorders of sex development. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 96, E1131-1136.

Kojima, Y., Kohri, K., and Hayashi, Y. (2010). Genetic pathway of external genitalia formation and molecular etiology of hypospadias. *J Pediatr Urol* 6, 346–354.

Kon, M., Suzuki, E., Dung, V.C., Hasegawa, Y., Mitsui, T., Muroya, K., Ueoka, K., Igarashi, N., Nagasaki, K., Oto, Y., et al. (2015). Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. *Hum. Reprod.* 30, 499–506.

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.

Koren, G., Carnevale, A., Ling, J., Ozsarfaty, J., Kapur, B., and Bagli, D. (2019). Fetal exposure to polybrominated diphenyl ethers and the risk of hypospadias: focus on the congeners involved. *Journal of Pediatric Urology* 15, 405.e1-405.e6.

Koskenniemi, J.J., Virtanen, H.E., Kiviranta, H., Damgaard, I.N., Matomäki, J., Thorup, J.M., Hurme, T., Skakkebaek, N.E., Main, K.M., and Toppari, J. (2015). Association between levels of persistent organic pollutants in adipose tissue and cryptorchidism in early childhood: a case-control study. *Environ Health* 14, 78.

Krantz, D., Goetzl, L., Simpson, J.L., Thom, E., Zachary, J., Hallahan, T.W., Silver, R., Pergament, E., Platt, L.D., Filkins, K., et al. (2004). Association of extreme first-trimester free human chorionic gonadotropin-beta, pregnancy-associated plasma protein A, and nuchal translucency with intrauterine growth restriction and other adverse pregnancy outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 191, 1452–1458.

- Kristensen, D.M., Hass, U., Lesné, L., Lottrup, G., Jacobsen, P.R., Desdoits-Lethimonier, C., Boberg, J., Petersen, J.H., Toppari, J., Jensen, T.K., et al. (2011). Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. *Hum. Reprod* 26, 235–244.
- Kumar, R., Atamna, H., Zakharov, M.N., Bhasin, S., Khan, S.H., and Jasuja, R. (2011). Role of the androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer, and spinal and bulbar muscular atrophy. *Life Sci.* 88, 565–571.
- Kurokawa, S., Kojima, Y., Mizuno, K., Kamisawa, H., Tozawa, K., Kohri, K., and Hayashi, Y. (2011). Association of prolactin-induced protein with preputial development of hypospadias. *BJU Int.*
- 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.
- La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., Harding, A.E., and Fischbeck, K.H. (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352, 77–79.
- Laporte, J., Kioschis, P., Hu, L.J., Kretz, C., Carlsson, B., Poustka, A., Mandel, J.L., and Dahl, N. (1997). Cloning and characterization of an alternatively spliced gene in proximal Xq28 deleted in two patients with intersexual genitalia and myotubular myopathy. *Genomics* 41, 458–462.
- Larney, C., Bailey, T.L., and Koopman, P. (2014). Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry. *Development* 141, 2195–2205.
- Le Caignec, C., Delnatte, C., Vermeesch, J.R., Boceno, M., Joubert, M., Lavenant, F., David, A., and Rival, J.-M. (2007). Complete sex reversal in a WAGR syndrome patient. *Am. J. Med. Genet. A* 143A, 2692–2695.
- Lek, N., Miles, H., Bunch, T., Pilfold-Wilkie, V., Tadokoro-Cuccaro, R., Davies, J., Ong, K.K., and Hughes, I.A. (2014). Low frequency of androgen receptor gene mutations in 46 XY DSD, and fetal growth restriction. *Arch. Dis. Child.* 99, 358–361.
- Liberman, R.F., Getz, K.D., Heinke, D., Luke, B., Stern, J.E., Declercq, E.R., Chen, X., Lin, A.E., and Anderka, M. (2017). Assisted Reproductive Technology and Birth Defects: Effects of Subfertility and Multiple Births. *Birth Defects Res* 109, 1144–1153.
- Lim, H.N., Chen, H., McBride, S., Dunning, A.M., Nixon, R.M., Hughes, I.A., and Hawkins, J.R. (2000). Longer polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with moderate to severe undermasculinized genitalia in XY males. *Hum. Mol. Genet* 9, 829–834.
- Lin, L., and Achermann, J.C. (2008). Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev* 2, 200–209.

- Liu, S.-B., Ma, Z., Sun, W.-L., Sun, X.-W., Hong, Y., Ma, L., Qin, C., Stratton, H.J., Liu, Q., and Jiang, J.-T. (2012). The role of androgen-induced growth factor (FGF8) on genital tubercle development in a hypospadiac male rat model of prenatal exposure to di-n-butyl phthalate. *Toxicology* 293, 53–58.
- Loke, J., Pearlman, A., Radi, O., Zuffardi, O., Giussani, U., Pallotta, R., Camerino, G., and Ostrer, H. (2014). Mutations in MAP3K1 tilt the balance from SOX9/FGF9 to WNT/ β -catenin signaling. *Hum. Mol. Genet.* 23, 1073–1083.
- 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 in Endocrinology and Metabolism* 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.
- Lumbroso, R., Beitel, L.K., Vasiliou, D.M., Trifiro, M.A., and Pinsky, L. (1997). Codon-usage variants in the polymorphic (GGN)_n trinucleotide repeat of the human androgen receptor gene. *Hum. Genet.* 101, 43–46.
- Lund, L., Engebjerg, M.C., Pedersen, L., Ehrenstein, V., Nørgaard, M., and Sørensen, H.T. (2009). Prevalence of hypospadias in Danish boys: a longitudinal study, 1977-2005. *Eur. Urol.* 55, 1022–1026.
- Lunkes, A., Trottier, Y., and Mandel, J.L. (1998). Pathological mechanisms in Huntington’s disease and other polyglutamine expansion diseases. *Essays Biochem* 33, 149–163.
- Ma, Q., Tang, Y., Lin, H., Xu, M., Xu, G., Fang, X., Chen, J., Song, Z., Li, Z., Shi, Y., et al. (2015). Diacylglycerol kinase κ (DGKK) variants and hypospadias in Han Chinese: association and meta-analysis. *BJU Int.* 116, 634–640.
- 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.
- Macdonald, J., Kilcoyne, K.R., Sharpe, R.M., Kavanagh, Á., Anderson, R.A., Brown, P., Smith, L.B., Jørgensen, A., and Mitchell, R.T. (2018). DMRT1 repression using a novel approach to genetic manipulation induces testicular dysgenesis in human fetal gonads. *Hum. Reprod.* 33, 2107–2121.

Macleod, D.J., Sharpe, R.M., Welsh, M., Fiskens, M., Scott, H.M., Hutchison, G.R., Drake, A.J., and van den Driesche, S. (2010). Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. *Int. J. Androl* 33, 279–287.

Mahawong, P., Sinclair, A., Li, Y., Schlomer, B., Rodriguez, E., Ferretti, M.M., Liu, B., Baskin, L.S., and Cunha, G.R. (2014). Comparative effects of neonatal diethylstilbestrol on external genitalia development in adult males of two mouse strains with differential estrogen sensitivity. *Differentiation* 88, 70–83.

Mäkelä, J.-A., Koskenniemi, J.J., Virtanen, H.E., and Toppari, J. (2019). Testis Development. *Endocr. Rev.* 40, 857–905.

Mamsen, L.S., Ernst, E.H., Borup, R., Larsen, A., Olesen, R.H., Ernst, E., Anderson, R.A., Kristensen, S.G., and Andersen, C.Y. (2017). Temporal expression pattern of genes during the period of sex differentiation in human embryonic gonads. *Sci Rep* 7, 15961.

Marengo, L., Farag, N.H., and Canfield, M. (2013). Body mass index and birth defects: Texas, 2005-2008. *Matern Child Health J* 17, 1898–1907.

Marrocco, G., Grammatico, P., Vallasciani, S., Gulia, C., Zangari, A., Marrocco, F., Bateni, Z.H., Porrello, A., and Piergentili, R. (2015). Environmental, parental and gestational factors that influence the occurrence of hypospadias in male patients. *J Pediatr Urol* 11, 12–19.

Martineau, J., Nordqvist, K., Tilmann, C., Lovell-Badge, R., and Capel, B. (1997). Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr. Biol.* 7, 958–968.

Martinerie, L., Morel, Y., Gay, C.-L., Pienkowski, C., de Kerdanet, M., Cabrol, S., Lecointre, C., Coutant, R., Baron, S., Colle, M., et al. (2012). Impaired puberty, fertility, and final stature in 45,X/46,XY mixed gonadal dysgenetic patients raised as boys. *Eur. J. Endocrinol.* 166, 687–694.

Massaro, P.A., MacLellan, D.L., Anderson, P.A., and Romao, R.L.P. (2015). Does intracytoplasmic sperm injection pose an increased risk of genitourinary congenital malformations in offspring compared to in vitro fertilization? A systematic review and meta-analysis. *J. Urol.* 193, 1837–1842.

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.

Mavrogenis, S., Urban, R., Czeizel, A.E., and Acs, N. (2014). Maternal risk factors in the origin of isolated hypospadias: a population-based case-control study. *Congenit Anom (Kyoto)* 54, 110–115.

McComb, J., Mills, I.G., Muller, M., Berntsen, H.F., Zimmer, K.E., Ropstad, E., Verhaegen, S., and Connolly, L. (2019). Human blood-based exposure levels of persistent organic pollutant (POP) mixtures antagonise androgen receptor transactivation and translocation. *Environ Int* 132, 105083.

McElreavey, K., Jorgensen, A., Eozenou, C., Merel, T., Bignon-Topalovic, J., Tan, D.S., Houzelstein, D., Buonocore, F., Warr, N., Kay, R.G.G., et al. (2019). Pathogenic variants in the DEAH-box RNA helicase DHX37 are a frequent cause of 46,XY gonadal dysgenesis and 46,XY testicular regression syndrome. *Genet. Med.*

Meeks, J.J., Weiss, J., and Jameson, J.L. (2003). Dax1 is required for testis determination. *Nat. Genet.* 34, 32–33.

Mendonca, B.B., Costa, E.M.F., Belgorosky, A., Rivarola, M.A., and Domenice, S. (2010). 46,XY DSD due to impaired androgen production. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 24, 243–262.

Micali, G., Nasca, M.R., Innocenzi, D., Frasin, L.A., Radi, O., Parma, P., Camerino, G., and Schwartz, R.A. (2005). Association of palmoplantar keratoderma, cutaneous squamous cell carcinoma, dental anomalies, and hypogenitalism in four siblings with 46,XX karyotype: a new syndrome. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53, S234-239.

Michikawa, T., Yamazaki, S., Ono, M., Kuroda, T., Nakayama, S.F., Suda, E., Isobe, T., Iwai-Shimada, M., Kobayashi, Y., Yonemoto, J., et al. (2019). Isoflavone Intake in Early Pregnancy and Hypospadias in the Japan Environment and Children's Study. *Urology* 124, 229–236.

Mishra, S.K., Balasenthil, S., Nguyen, D., and Vadlamudi, R.K. (2004). Cloning and functional characterization of PELP1/MNAR promoter. *Gene* 330, 115–122.

Miyagawa, S., Matsumaru, D., Murashima, A., Omori, A., Satoh, Y., Haraguchi, R., Motoyama, J., Iguchi, T., Nakagata, N., Hui, C.-C., et al. (2011). The role of sonic hedgehog-Gli2 pathway in the masculinization of external genitalia. *Endocrinology* 152, 2894–2903.

Mohnach, L., Fechner, P.Y., and Keegan, C.E. (2016). Nonsyndromic disorders of testicular development. In *GeneReviews*®[Internet], (University of Washington, Seattle), p.

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.

Molsberry, R.L., Carr, B.R., Mendelson, C.R., and Simpson, E.R. (1982). Human chorionic gonadotropin binding to human fetal testes as a function of gestational age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55, 791–794.

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.

Moore, K.L., and Persaud, T.V.N. (2003). *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology* (Saunders (W.B.) Co Ltd).

Morera, A.M., Valmalle, A.F., Asensio, M.J., Chossegros, L., Chauvin, M.A., Durand, P., and Mouriquand, P.D.E. (2006). A study of risk factors for hypospadias in the Rhône-Alpes region (France). *J Pediatr Urol* 2, 169–177.

Mouriquand, P.D.E., and Mure, P.-Y. (2004). Current concepts in hypospadiology. *BJU Int.* 93 *Suppl* 3, 26–34.

Mouriquand, P.D.E., Gorduza, D.B., Gay, C.-L., Meyer-Bahlburg, H.F.L., Baker, L., Baskin, L.S., Bouvattier, C., Braga, L.H., Caldamone, A.C., Duranteau, L., et al. (2016). Surgery in disorders of sex development (DSD) with a gender issue: If (why), when, and how? *J Pediatr Urol* 12, 139–149.

Mousa, H., Hyman, P.E., Cocjin, J., Flores, A.F., and Di Lorenzo, C. (2002). Long-term outcome of congenital intestinal pseudoobstruction. *Dig. Dis. Sci.* 47, 2298–2305.

Mueller, R.F. (1994). The Denys-Drash syndrome. *J. Med. Genet.* 31, 471–477.

Muroya, K., Okuyama, T., Goishi, K., Ogiso, Y., Fukuda, S., Kameyama, J., Sato, H., Suzuki, Y., Terasaki, H., Gomyo, H., et al. (2000). Sex-determining gene(s) on distal 9p: clinical and molecular studies in six cases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 3094–3100.

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.

Nakamura, M., Fukami, M., Sugawa, F., Miyado, M., Nonomura, K., and Ogata, T. (2011). Mamld1 knockdown reduces testosterone production and Cyp17a1 expression in mouse Leydig tumor cells. *PLoS ONE* 6, e19123.

Nef, S., Stévant, I., and Greenfield, A. (2019). Characterizing the bipotential mammalian gonad. *Curr. Top. Dev. Biol.* 134, 167–194.

Nelson, D.B., Chalak, L.F., McIntire, D.D., and Leveno, K.J. (2015). Is preeclampsia associated with fetal malformation? A review and report of original research. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 28, 2135–2140.

Norris, W., Nevers, T., Sharma, S., and Kalkunte, S. (2011). Review: hCG, preeclampsia and regulatory T cells. *Placenta* 32 *Suppl* 2, S182-185.

Ogata, T., Laporte, J., and Fukami, M. (2009). MAMLD1 (CXorf6): a new gene involved in hypospadias. *Horm. Res* 71, 245–252.

Ollivier, M., Paris, F., Philibert, P., Garnier, S., Coffy, A., Fauconnet-Servant, N., Haddad, M., Guys, J.M., Reynaud, R., Faure, A., et al. (2018). Family History is Underestimated in Children with Isolated Hypospadias: A French Multicenter Report of 88 Families. *J. Urol.* 200, 890–894.

Orkiszewski, M. (2012). A standardized classification of hypospadias. *J Pediatr Urol* 8, 410–414.

Örtqvist, L., Fossum, M., Andersson, M., Nordenström, A., Frisén, L., Holmdahl, G., and Nordenskjöld, A. (2015). Long-term followup of men born with hypospadias: urological and cosmetic results. *J. Urol.* 193, 975–981.

O'Shaughnessy, P.J., Antignac, J.P., Le Bizec, B., Morvan, M.-L., Svechnikov, K., Söder, O., Savchuk, I., Monteiro, A., Soffientini, U., Johnston, Z.C., et al. (2019). Alternative (backdoor) androgen production and masculinization in the human fetus. *PLoS Biol.* 17, e3000002.

Pailhoux, E., Vigier, B., Vaiman, D., Servel, N., Chaffaux, S., Crihiu, E.P., and Cotinot, C. (2002). Ontogenesis of female-to-male sex-reversal in XX polled goats. *Dev. Dyn.* 224, 39–50.

Parada-Bustamante, A., Lardone, M.C., Madariaga, M., Johnson, M.C., Codner, E., Cassorla, F., and Castro, A. (2012). Androgen receptor CAG and GGN polymorphisms in boys with isolated hypospadias. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 25, 157–162.

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.

Pedace, L., Laino, L., Preziosi, N., Valentini, M.S., Scommegna, S., Rapone, A.M., Guarino, N., Boscherini, B., De Bernardo, C., Marrocco, G., et al. (2014). Longitudinal hormonal evaluation in a patient with disorder of sexual development, 46,XY karyotype and one NR5A1 mutation. *Am. J. Med. Genet. A* 164A, 2938–2946.

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.* 196, 427–433.

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.

Pfistermuller, K.L.M., McArdle, A.J., and Cuckow, P.M. (2015). Meta-analysis of complication rates of the tubularized incised plate (TIP) repair. *J Pediatr Urol* 11, 54–59.

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* 164A, 2618–2622.

Piccoli, G.B., Clari, R., Vigotti, F.N., Leone, F., Attini, R., Cabiddu, G., Mauro, G., Castelluccia, N., Colombi, N., Capizzi, I., et al. (2015). Vegan-vegetarian diets in pregnancy: danger or panacea? A systematic narrative review. *BJOG* 122, 623–633.

Portnoi, M.-F., Dumargne, M.-C., Rojo, S., Witchel, S.F., Duncan, A.J., Eozenou, C., Bignon-Topalovic, J., Yatsenko, S.A., Rajkovic, A., Reyes-Mugica, M., et al. (2018). Mutations involving the SRY-related gene SOX8 are associated with a spectrum of human reproductive anomalies. *Hum. Mol. Genet.* 27, 1228–1240.

Prats, P., Rodríguez, I., Comas, C., and Puerto, B. (2012). First trimester risk assessment for trisomy 21 in twin pregnancies combining nuchal translucency and first trimester biochemical markers. *Prenat. Diagn.* 32, 927–932.

Qiao, L., Tasian, G.E., Zhang, H., Cao, M., Ferretti, M., Cunha, G.R., and Baskin, L.S. (2012). Androgen receptor is overexpressed in boys with severe hypospadias, and ZEB1 regulates androgen receptor expression in human foreskin cells. *Pediatr. Res.* 71, 393–398.

Radpour, R., Rezaee, M., Tavasoly, A., Solati, S., and Saleki, A. (2007). Association of long polyglycine tracts (GGN repeats) in exon 1 of the androgen receptor gene with cryptorchidism and penile hypospadias in Iranian patients. *J. Androl.* 28, 164–169.

Raghavan, R., Romano, M.E., Karagas, M.R., and Penna, F.J. (2018). Pharmacologic and Environmental Endocrine Disruptors in the Pathogenesis of Hypospadias: a Review. *Curr Environ Health Rep* 5, 499–511.

Rahmoun, M., Lavery, R., Laurent-Chaballier, S., Bellora, N., Philip, G.K., Rossitto, M., Symon, A., Pailhoux, E., Cammas, F., Chung, J., et al. (2017). In mammalian foetal testes, SOX9 regulates expression of its target genes by binding to genomic regions with conserved signatures. *Nucleic Acids Res.* 45, 7191–7211.

Rappazzo, K.M., Warren, J.L., Davalos, A.D., Meyer, R.E., Sanders, A.P., Brownstein, N.C., and Luben, T.J. (2019). Maternal residential exposure to specific agricultural pesticide active ingredients and birth defects in a 2003-2005 North Carolina birth cohort. *Birth Defects Res* 111, 312–323.

Ratan, S.K., Aggarwal, S., Mishra, T.K., Saxena, A., Yadav, S., Pandey, R., Sharma, A., and Dhanwal, D. (2012). Children with isolated hypospadias have different hormonal profile compared to those with associated anomalies. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 25, 111–119.

Ren, S., Haynes, E., Hall, E., Hossain, M., Chen, A., Muglia, L., Lu, L., and DeFranco, E. (2018). Periconception Exposure to Air Pollution and Risk of Congenital Malformations. *J. Pediatr.* 193, 76-84.e6.

Reutens, A.T., Achermann, J.C., Ito, M., Ito, M., Gu, W.X., Habiby, R.L., Donohue, P.A., Pang, S., Hindmarsh, P.C., and Jameson, J.L. (1999). Clinical and functional effects of mutations in the DAX-1 gene in patients with adrenal hypoplasia congenita. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 504–511.

- Rynja, S.P., de Jong, T.P.V.M., Bosch, J.L.H.R., and de Kort, L.M.O. (2018). Testosterone prior to hypospadias repair: Postoperative complication rates and long-term cosmetic results, penile length and body height. *J Pediatr Urol* 14, 31.e1-31.e8.
- Salam, M.A. (2013). Principles and Practice of Urology (JP Medical Ltd).
- Sampath, D., Zhu, Y., Winneker, R.C., and Zhang, Z. (2001). Aberrant expression of Cyr61, a member of the CCN (CTGF/Cyr61/Cef10/NOVH) family, and dysregulation by 17 beta-estradiol and basic fibroblast growth factor in human uterine leiomyomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1707–1715.
- Samtani, R., Bajpai, M., Vashisht, K., Ghosh, P.K., and Saraswathy, K.N. (2011). Hypospadias risk and polymorphism in SRD5A2 and CYP17 genes: case-control study among Indian children. *J. Urol* 185, 2334–2339.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467.
- Sata, F., Kurahashi, N., Ban, S., Moriya, K., Tanaka, K.D., Ishizuka, M., Nakao, H., Yahata, Y., Imai, H., Kakizaki, H., et al. (2010). Genetic polymorphisms of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3 and the risk of hypospadias. *J Sex Med* 7, 2729–2738.
- Sathyanarayana, S., Butts, S., Wang, C., Barrett, E., Nguyen, R., Schwartz, S.M., Haaland, W., Swan, S.H., and TIDES Team (2017). Early Prenatal Phthalate Exposure, Sex Steroid Hormones, and Birth Outcomes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 102, 1870–1878.
- Schnack, T.H., Zdravkovic, S., Myrup, C., Westergaard, T., Christensen, K., Wohlfahrt, J., and Melbye, M. (2008). Familial aggregation of hypospadias: a cohort study. *Am. J. Epidemiol.* 167, 251–256.
- Schneuer, F.J., Bower, C., Holland, A.J.A., Tasevski, V., Jamieson, S.E., Barker, A., Lee, L., Majzoub, J.A., and Nassar, N. (2016). Maternal first trimester serum levels of free-beta human chorionic gonadotrophin and male genital anomalies. *Hum. Reprod.* 31, 1895–1903.
- Schönbucher, V.B., Weber, D.M., and Landolt, M.A. (2008). Psychosocial adjustment, health-related quality of life, and psychosexual development of boys with hypospadias: a systematic review. *J Pediatr Psychol* 33, 520–535.
- Schwarz, J.M., Rödelsperger, C., Schuelke, M., and Seelow, D. (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat. Methods* 7, 575–576.
- Scott, H.M., Mason, J.I., and Sharpe, R.M. (2009). Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr. Rev.* 30, 883–925.

Sekaran, P., O'Toole, S., Flett, M., and Cascio, S. (2013). Increased occurrence of disorders of sex development, prematurity and intrauterine growth restriction in children with proximal hypospadias associated with undescended testes. *J. Urol.* *189*, 1892–1896.

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.

Sheriff, F.R., Lopez, A., Lupo, P.J., Seth, A., Jorgez, C., and Agopian, A.J. (2019). Maternal hypertension and hypospadias in offspring: A systematic review and meta-analysis. *Birth Defects Res* *111*, 9–15.

Sheth, K.R., Kovar, E., White, J.T., Chambers, T.M., Peckham-Gregory, E.C., O'Neill, M., Langlois, P.H., Seth, A., Scheurer, M.E., Lupo, P.J., et al. (2019). Hypospadias risk is increased with maternal residential exposure to hormonally active hazardous air pollutants. *Birth Defects Res* *111*, 345–352.

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.

Singh, N., Gupta, D.K., Sharma, S., Sahu, D.K., Mishra, A., Yadav, D.K., Rawat, J., and Singh, A.K. (2018). Single-nucleotide and copy-number variance related to severity of hypospadias. *Pediatr. Surg. Int.* *34*, 991–1008.

Sirianni, R., Seely, J.B., Attia, G., Stocco, D.M., Carr, B.R., Pezzi, V., and Rainey, W.E. (2002). Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. *J. Endocrinol.* *174*, R13-17.

Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., and Main, K.M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod.* *16*, 972–978.

Skinner, M.K. (2016). Endocrine disruptors in 2015: Epigenetic transgenerational inheritance. *Nat Rev Endocrinol* *12*, 68–70.

Snodgrass, W., Macedo, A., Hoebeke, P., and Mouriquand, P.D.E. (2011). Hypospadias dilemmas: a round table. *J Pediatr Urol* *7*, 145–157.

Spinoit, A.-F. (2019). Hypospadias increased prevalence in Surveillance Systems for Birth Defects is observed: Next to climate change are we going towards a human fertility alteration? *Eur. Urol.*

Spinoit, A.-F., and Hoebeke, P. (2015). Paediatrics: Urinary flow rate after TIP urethroplasty for hypospadias. *Nat Rev Urol* *12*, 477–478.

- Spinoit, A.-F., Poelaert, F., Groen, L.-A., Van Laecke, E., and Hoebeke, P. (2013). Hypospadias repair at a tertiary care center: long-term followup is mandatory to determine the real complication rate. *J. Urol.* *189*, 2276–2281.
- Springer, A., and Baskin, L.S. (2014). Timing of hypospadias repair in patients with disorders of sex development. *Endocr Dev* *27*, 197–202.
- Springer, A., van den Heijkant, M., and Baumann, S. (2016). Worldwide prevalence of hypospadias. *Journal of Pediatric Urology* *12*, 152.e1-152.e7.
- Sultan, C., Balaguer, P., Terouanne, B., Georget, V., Paris, F., Jeandel, C., Lombroso, S., and Nicolas, J. (2001). Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* *178*, 99–105.
- Suntharalingham, J.P., Buonocore, F., Duncan, A.J., and Achermann, J.C. (2015). DAX-1 (NR0B1) and steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) in human disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *29*, 607–619.
- Talukder, A.H., Meng, Q., and Kumar, R. (2006). CRIPak, a novel endogenous Pak1 inhibitor. *Oncogene* *25*, 1311–1319.
- Tan, C., Zhao, Y., and Wang, S. (2019). Is a vegetarian diet safe to follow during pregnancy? A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* *59*, 2586–2596.
- Tao, R.-H., Kawate, H., Ohnaka, K., Ishizuka, M., Hagiwara, H., and Takayanagi, R. (2006). Opposite effects of alternative TZF spliced variants on androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *341*, 515–521.
- 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. *Development* *129*, 4627–4634.
- Thai, H.T.T., Kalbasi, M., Lagerstedt, K., Frisén, L., Kockum, I., and Nordenskjöld, A. (2005). The valine allele of the V89L polymorphism in the 5-alpha-reductase gene confers a reduced risk for hypospadias. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *90*, 6695–6698.
- Thai, H.T.T., Söderhäll, C., Lagerstedt, K., Omrani, M.D., Frisén, L., Lundin, J., Kockum, I., and Nordenskjöld, A. (2008). A new susceptibility locus for hypospadias on chromosome 7q32.2-q36.1. *Hum. Genet* *124*, 155–160.
- Thankamony, A., Pasterski, V., Ong, K.K., Acerini, C.L., and Hughes, I.A. (2016). Anogenital distance as a marker of androgen exposure in humans. *Andrology* *4*, 616–625.
- Thorup, J., Nordenskjöld, A., and Hutson, J.M. (2014). Genetic and environmental origins of hypospadias. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* *21*, 227–232.
- Toufaily, M.H., Roberts, D.J., Westgate, M.-N., Hunt, A.-T., and Holmes, L.B. (2018). Hypospadias, Intrauterine Growth Restriction, and Abnormalities of the Placenta. *Birth Defects Res* *110*, 122–127.

Tournaire, M., Devouche, E., Epelboin, S., Cabau, A., Dunbavand, A., and Levadou, A. (2018). Birth defects in children of men exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *Therapie* 73, 399–407.

Travison, T.G., Shackelton, R., Araujo, A.B., Morley, J.E., Williams, R.E., Clark, R.V., and McKinlay, J.B. (2010). Frailty, serum androgens, and the CAG repeat polymorphism: results from the Massachusetts Male Aging Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 2746–2754.

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.

Vadlamudi, R.K., Wang, R.A., Mazumdar, A., Kim, Y., Shin, J., Sahin, A., and Kumar, R. (2001). Molecular cloning and characterization of PELP1, a novel human coregulator of estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 276, 38272–38279.

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.

Van Zutphen, A.R., Werler, M.M., Browne, M.M., Romitti, P.A., Bell, E.M., McNutt, L.-A., Druschel, C.M., Mitchell, A.A., and National Birth Defects Prevention Study (2014). Maternal hypertension, medication use, and hypospadias in the National Birth Defects Prevention Study. *Obstet Gynecol* 123, 309–317.

Veiby, G., Daltveit, A.K., Engelsen, B.A., and Gilhus, N.E. (2014). Fetal growth restriction and birth defects with newer and older antiepileptic drugs during pregnancy. *J. Neurol.* 261, 579–588.

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. *Development* 125, 2665–2675.

Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F.D., Keutel, J., Hustert, E., et al. (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79, 1111–1120.

Wang, M.-H., and Baskin, L.S. (2008). Endocrine disruptors, genital development, and hypospadias. *J. Androl* 29, 499–505.

Wang, Y., Li, Q., Xu, J., Liu, Q., Wang, W., Lin, Y., Ma, F., Chen, T., Li, S., and Shen, Y. (2004). Mutation analysis of five candidate genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur. J. Hum. Genet* 12, 706–712.

Watanabe, H., Nonoguchi, K., Sakurai, T., Masuda, T., Itoh, K., and Fujita, J. (2005). A novel protein Depp, which is induced by progesterone in human endometrial stromal cells activates Elk-1 transcription factor. *Mol. Hum. Reprod.* 11, 471–476.

Watanabe, M., Yoshida, R., Ueoka, K., Aoki, K., Sasagawa, I., Hasegawa, T., Sueoka, K., Kamatani, N., Yoshimura, Y., and Ogata, T. (2007). Haplotype analysis

of the estrogen receptor 1 gene in male genital and reproductive abnormalities. *Hum. Reprod.* 22, 1279–1284.

Weber, D.M., Schonbucher, V.B., Gobet, R., Gerber, A., and Landolt, M.A. (2009). Is there an ideal age for hypospadias repair? A pilot study. *J Pediatr Urol* 5, 345–350.

Welsh, M., Saunders, P.T.K., Fisker, M., Scott, H.M., Hutchison, G.R., Smith, L.B., and Sharpe, R.M. (2008). Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J. Clin. Invest* 118, 1479–1490.

White, J.T., Kovar, E., Chambers, T.M., Sheth, K.R., Peckham-Gregory, E.C., O'Neill, M., Langlois, P.H., Jorgez, C.J., Lupo, P.J., and Seth, A. (2019). Hypospadias Risk from Maternal Residential Exposure to Heavy Metal Hazardous Air Pollutants. *Int J Environ Res Public Health* 16.

Wilhelm, D. (2002). The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes & Development* 16, 1839–1851.

Wilhelm, D., Palmer, S., and Koopman, P. (2007). Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiological Reviews* 87, 1–28.

Williams, C., Sutcliffe, A., and Sebire, N.J. (2010). Congenital malformations after assisted reproduction: risks and implications for prenatal diagnosis and fetal medicine. *Ultrasound Obstet Gynecol* 35, 255–259.

Willihnganz-Lawson, K.H., Isharwal, S., Lewis, J.M., Sarafoglou, K., Boisclair-Fahey, A., and Shukla, A.R. (2013). Secondary vaginoplasty for disorders for sexual differentiation: is there a right time? Challenges with compliance and follow-up at a multidisciplinary center. *J Pediatr Urol* 9, 627–632.

Willingham, E., and Baskin, L.S. (2007). Candidate genes and their response to environmental agents in the etiology of hypospadias. *Nat Clin Pract Urol* 4, 270–279.

Wright, I., Cole, E., Farrokhyar, F., Pemberton, J., Lorenzo, A.J., and Braga, L.H. (2013). Effect of preoperative hormonal stimulation on postoperative complication rates after proximal hypospadias repair: a systematic review. *J. Urol.* 190, 652–659.

Wu, J.Y., McGown, I.N., Lin, L., Achermann, J.C., Harris, M., Cowley, D.M., Aftimos, S., Neville, K., Choong, C., and Cotterill, A.M. (2012). A novel NR5A1 variant in an infant with elevated testosterone from an Australasian Cohort of 46,XY patients with Disorders of Sex Development. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*.

Yang, Q., Qu, W.Y., Yang, L., Wang, K., Tu, H.Y., and Wang, J. (2014). Literature on the aetiology of hypospadias in the last 5 years: molecular mechanism and environmental factors. *Andrologia* 46, 583–591.

Yang, S., Weng, H., Chen, L., Guo, X., Parra, M., Conboy, J., Debnath, G., Lambert, A.J., Peters, L.L., Baines, A.J., et al. (2011). Lack of protein 4.1G causes altered expression and localization of the cell adhesion molecule nectin-like 4 in testis and can cause male infertility. *Mol. Cell. Biol.* 31, 2276–2286.

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.

Yinon, Y., Kingdom, J.C.P., Odutayo, A., Moineddin, R., Drewlo, S., Lai, V., Cherney, D.Z.I., and Hladunewich, M.A. (2010a). Vascular dysfunction in women with a history of preeclampsia and intrauterine growth restriction: insights into future vascular risk. *Circulation* *122*, 1846–1853.

Yinon, Y., Kingdom, J.C.P., Proctor, L.K., Kelly, E.N., Salle, J.L.P., Wherrett, D., Keating, S., Nevo, O., and Chitayat, D. (2010b). Hypospadias in males with intrauterine growth restriction due to placental insufficiency: the placental role in the embryogenesis of male external genitalia. *Am. J. Med. Genet. A* *152A*, 75–83.

Yu, X., Nassar, N., Mastroiacovo, P., Canfield, M., Groisman, B., Bermejo-Sánchez, E., Ritvanen, A., Kiuru-Kuhlefelt, S., Benavides, A., Sipek, A., et al. (2019). Hypospadias Prevalence and Trends in International Birth Defect Surveillance Systems, 1980-2010. *Eur. Urol.*

van der Zanden, L.F.M., van Rooij, I.A.L.M., Feitz, W.F.J., Vermeulen, S.H.H.M., Kiemeny, L.A.L.M., Knoers, N.V.A.M., Roeleveld, N., and Franke, B. (2010). Genetics of hypospadias: are single-nucleotide polymorphisms in SRD5A2, ESR1, ESR2, and ATF3 really associated with the malformation? *J. Clin. Endocrinol. Metab* *95*, 2384–2390.

van der Zanden, L.F.M., van Rooij, I.A.L.M., Feitz, W.F.J., Knight, J., Donders, A.R.T., Renkema, K.Y., Bongers, E.M.H.F., Vermeulen, S.H.H.M., Kiemeny, L.A.L.M., Veltman, J.A., et al. (2011). Common variants in DGKK are strongly associated with risk of hypospadias. *Nat. Genet* *43*, 48–50.

van der Zanden, L.F.M., van Rooij, I.A.L.M., Feitz, W.F.J., Franke, B., Knoers, N.V.A.M., and Roeleveld, N. (2012). Aetiology of hypospadias: a systematic review of genes and environment. *Hum. Reprod. Update* *18*, 260–283.

Zhang, M., Yang, J., Zhang, H., Ning, G., Li, X., and Sun, S. (2011). A novel SRD5A2 mutation with loss of function identified in chinese patients with hypospadias. *Horm Res Paediatr* *76*, 44–49.

Zhao, S., Li, D., Bei, X.-Y., Zhu, Y.-P., Sun, W.-L., Shen, C., Wood, K., Han, B.-M., and Jiang, J.-T. (2018). Maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP) promotes epithelial-mesenchymal transition via regulation of autophagy in uroepithelial cell. *Toxicology* *406–407*, 114–122.

Zhou, J., Wang, H., Peng, Y.-B., Chen, Q., Da, J., Wang, Z., and Ma, L.-M. (2009). [Expressions of ATF3 and CTGF and their regulation by estradiol in the prepuce of hypospadias patients]. *Zhonghua Nan Ke Xue* *15*, 1075–1080.

Zimmermann, E.F., and Woodward, M.N. (2014). Isolated preputial reconstruction in distal hypospadias. *J Pediatr Urol* *10*, 399.e1-2.

VIII. Valorisation du travail de thèse

A. Articles originaux avec comité de lecture

1. Peycelon M., Mansour-Hendili L., Hyon C., Collot N., Houang M., Chabaud M., Bouvier M.-D., Legendre M., Chabaud M., Audry G., Amselem S., Siffroi J.-P.: Recurrent intragenic duplication within the *NR5A1* gene and severe proximal hypospadias. *Sexual Development*. 2018 Jan 13. doi: 10.1159/000485909.
2. Hyon C., Chantot-Bastarud S., Harbuz R., Bhourri R., Perot N., Peycelon M., Sibony M., Rojo S., Piguel X., Bilan F., Gilbert-Dussadier B., Kitzis A., McElreavey K., Siffroi J.-P., Bashamboo A.: Refining the regulatory region upstream of *SOX9* associated with 46,XX testicular Disorders of Sex Development (DSD). *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2015 Apr 21. doi: 10.1002/ajmg.a.37101.
3. McElreavey K., Jorgensen A., Bignon-Topolavic J., Tan D.S., Houzelstein D., Buonocore F., Warr N., Kay R., Eozenou C., Peycelon M., Siffroi J.-P., Mazen I., Achermann J., Shcherbak Y., Léger J., Sallai A., Carel J.-C., Martinerie L., Le Ru R., Conway G., Mignot B., Van Maldergem L., Bertalan R., Globa E., Brauner R., Jauch R., Nef S., Greenfield A., Bashamboo A.: Pathogenic variants in the DEAH-box RNA helicase *DHX37* are a frequent cause of 46,XY gonadal dysgenesis and 46,XY testicular regression syndrome. *Genet Med*. 2019 Jul 24. doi: 10.1038/s41436-019-0606-y.

B. Revue avec comité de lecture

4. Peycelon M., Parmentier B., Raquillet C., Boubnova J., Chouikh T., Grosos C., Honart J.-F., Pichon A., Auber F., Larroquet M., Audry G. : Anomalies des organes génitaux du garçon. [Abnormalities of the penis in boys.]. *Arch Pediatr*. 2012 Dec;19(12):1347-53. doi: 10.1016/j.arcped.2012.09.014.

C. Publications didactiques

5. Grapin-Dagorno C., Peycelon M., Paye-Jaouen A., El Ghoneimi A. : Génitoplastie masculinisante. Rev. Méd. Périnat. Juillet 2015. DOI 10.1007/s12611-015-0332-x
6. Peycelon M., Frade F., Houang M., Hyon C., Siffroi J.-P., Audry G. : Prise en charge néonatale des anomalies des organes génitaux : le point de vue du chirurgien. Journées Parisiennes de Pédiatrie (non indexé). 2016.

D. Article accepté avec modifications mineures

7. Peycelon M., Lelong N., Carlier L., Monn M.F., De Chalus A., Bonnard A., Rachid M., Houang M., Paye-Jaouen A., Ali L., Lecourbe A., Grapin C., Audry G., Legendre M., Muller F., Dreux S., El Ghoneimi A., Benachi A., Khoshnood B., Siffroi J.-P.: Maternal first trimester serum levels of free beta human chorionic gonadotrophin and hypospadias : a population-based study. *Journal of Urology*.

E. Articles en cours de relecture par les co-auteurs

8. Peycelon M., Bloch A., Frade F., Morel H., Chantot-Bastaraud S., Quenum-Miraillet G., Monn M.F., Adams C.M., Hyon C., Houang M., Blanc T., Martinerie L., Paye-Jaouen A., Ali L., Grapin-Dagorno C., Audry G., Misseri R., Legendre M., El Ghoneimi A., Siffroi J.-P.: SNP-array analysis in children with isolated hypospadias.
9. Peycelon M., Frade F., Morel H., Hyon C., Houang M., Collot N., Dastot-Le Moal F., Soleyman C., Chantot-Bastaraud S., Grapin-Dagorno C., Haddad D., Audry G., Amselem S., Legendre M., El Ghoneimi A., Siffroi J.-P.: Comparison of Androgen Receptor (AR) gene sequences between blood lymphocytes and foreskin fibroblasts in boys with hypospadias.

F. Communications en congrès

1. *Germinal and Somatic Profile of NR5A1, MAMLD1 and AR Genes in Hypospadias* (M. Peycelon, M. Legendre, C. Hyon, F. Frade, N. Collot, F. Dastot-Le Moal, C. Soleyán, S. Chantot-Bastaraud, C. Grapin-Dagorno, G. Audry, S. Amselem, J.-P. Siffroi) au XXVth International Symposium on Paediatric Surgical Research (Londres, Royaume-Uni, septembre 2012)
2. *Profil génomique et somatique des gènes NR5A1, MAMLD1 et AR dans l'hypospadias* (M. Peycelon, F. Frade, C. Hyon, M. Legendre, N. Collot, F. Dastot-Le Moal, C. Soleyán, S. Chantot-Bastaraud, C. Grapin-Dagorno, G. Audry, S. Amselem, J.-P. Siffroi) au Forum de Recherche Chirurgicale de l'Académie Nationale de Chirurgie (A.N.C.), en association avec l'Association Française de Chirurgie (A.F.C.) (Paris, octobre 2012)
3. *Profil génomique et somatique du gène AR dans l'hypospadias* (M. Peycelon, F. Frade, C. Hyon, M. Legendre, N. Collot, F. Dastot-Le Moal, C. Soleyán, S. Chantot-Bastaraud, C. Grapin-Dagorno, G. Audry, S. Amselem, J.-P. Siffroi) au 106^{ème} Congrès de l'Association Française d'Urologie (A.F.U.) (Paris, novembre 2012)
4. *Genetic Profile in Germinal and Somatic Expressions of AR gene in Hypospadias* (M. Peycelon, F. Frade, C. Hyon, M. Legendre, N. Collot, F. Dastot-Le Moal, C. Soleyán, S. Chantot-Bastaraud, C. Grapin-Dagorno, G. Audry, S. Amselem, J.-P. Siffroi) au 24^{ème} Congrès annuel de l'European Society for Paediatric Urology (E.S.P.U.) (Gênes, Italie, avril 2013)
5. *Genetic Profile in Germinal and Somatic Expressions of AR gene in Hypospadias* (M. Peycelon, F. Frade, C. Hyon, M. Legendre, N. Collot, F. Dastot-Le Moal, C. Soleyán, S. Chantot-Bastaraud, C. Grapin-Dagorno, G. Audry, S. Amselem, J.-P. Siffroi) au Congrès de l'American Urological Association (A.U.A.) et au 61st Annual Meeting de la Society for Pediatric Urology (San Diego, CA, Etats-Unis, mai 2013)

6. *SNP-Array Analysis in Families of 33 Hypospadiac Children* (M. Peycelon, F. Frade, C. Hyon, M. Legendre, N. Collot, F. Dastot-Le Moal, C. Soleyman, S. Chantot-Bastaraud, C. Grapin-Dagorno, G. Audry, S. Amselem, J.-P. Siffroi) au Congrès de l'American Urological Association (A.U.A.) et 61st Annual Meeting de la Society for Pediatric Urology (San Diego, CA., Etats-Unis, mai 2013)

7. *Accuracy of Pelvic MRI in Evaluating Internal Genitalia in Patients with Disorders of Sex Development* (E. Nachar, L. Mahfouz, D. Rekik, M. Peycelon, J. Leger, A. Paye-Jaouen, M. Alison, A. El Ghoneimi, J.-C. Carel, L. Martinerie) lors du 9^{ème} congrès de l'European Society of Pediatric Endocrinology (E.S.P.E.) (Rome, Italie, Mai 2015)

8. *Recurrent intragenic duplication within the NR5A1 gene and severe posterior hypospadias* (M. Peycelon, L. Mansour-Hendili, C. Hyon, N. Collot, M. Houang, M. Legendre, M. Chabaud, M.-D. Bouvier, G. Audry, S. Amselem, J.-P. Siffroi) au 27^{ème} Congrès annuel de l'European Society for Paediatric Urology (E.S.P.U.) (Harrogate, Grande-Bretagne, juin 2016)

9. *Urethral intercourse in patients with vaginal anomalies: clinical experience and outcomes in 7 cases* (ML. Djordjevic, M. Bizic, M. Peycelon, B. Stojanovic) au 27^{ème} Congrès annuel de l'European Society for Paediatric Urology (E.S.P.U.) (Harrogate, Grande-Bretagne, juin 2016)

10. *Prise en charge néonatale des anomalies des organes génitaux : le point de vue du chirurgien* (M. Peycelon, F. Frade, M. Houang, C. Hyon, J.-P. Siffroi, G. Audry) aux Journées Parisiennes de Pédiatrie (Paris, France, octobre 2016)

11. *Are GATA4 gene variants associated with hypospadias?* (M. Peycelon, L. Carlier, M. Houang, G. Audry, S. Amselem, A. El Ghoneimi, J.-P. Siffroi, C. Hyon) au 28^{ème} Congrès annuel de l'European Society for Paediatric Urology (E.S.P.U.) (Barcelone, Espagne, avril 2017)

12. *46,XX SRY negative testicular and ovotesticular disorders in sex development : clinical aspects, molecular studies and management in 13 cases* (S. Lambert, C. Hyon, C. Bouvattier, M. Peycelon, L. Dumeige, M. Peuchmaur, J. Leger, D. Simon, A. Paye-Jaouen, J. Bouligand, J.-P. Siffroi, J.-C. Carel, K. McElreavey, A. El Ghoneimi, L. Martinerie) au 7^{ème} rencontre de la Société Française d'Endocrinologie et Diabétologie Pédiatrique (S.F.E.D.P.) (Paris, France, juin 2017)
13. *Variants du gène GATA4 et hypospadias : existe-t-il un lien ?* (M. Peycelon, L. Carlier, M. Houang, G. Audry, S. Amselem, A. El Ghoneimi, J.-P. Siffroi) au 74^{ème} Congrès de la Société Française de Chirurgie Pédiatrique (S.F.C.P.) et de la Société Française d'Urologie Pédiatrique et de l'Adolescent (S.F.U.P.A.) (Nice, France, octobre 2017)
14. *Présentation du Centre de Référence Maladies Rares : Malformations Rares des Voies Urinaires « MARVU » : une approche pluridisciplinaire de la vie fœtale à l'âge adulte* (A. El Ghoneimi, A. Paye-Jaouen, E. Carricaburu, M. Peycelon, C. Grapin-Dagorno, P. Philippe-Chomette, A. Bonnard, L. Ali) lors de la Journée Internationale des Maladies Rares (Paris, France, février 2018)
15. *Maternal first trimester serum levels of free beta human chorionic gonadotrophin and hypospadias* (M. Peycelon, L. Carlier, A. De Chalus, A. Bonnard, M. Rachid, M. Houang, A. Paye-Jaouen, G. Audry, S. Amselem, F. Muller, A. El Ghoneimi, A. Benachi, J.-P. Siffroi, C. Hyon) au 29^{ème} Congrès annuel de l'European Society for Paediatric Urology (E.S.P.U.) (Helsinki, Finlande, avril 2018)
16. *Maternal first trimester serum levels of free beta human chorionic gonadotrophin and hypospadias* (M. Peycelon, L. Carlier, A. De Chalus, A. Bonnard, M. Rachid, L. Ali, M. Houang, A. Paye-Jaouen, G. Audry, S. Amselem, F. Muller, A. El Ghoneimi, A. Benachi, J.-P. Siffroi, C. Hyon) au 19^{ème} congrès de l'European Paediatric Surgeons' Association (E.U.P.S.A.) et 75^{ème} congrès commun de la Société Française de Chirurgie Pédiatrique (S.F.C.P.) et de la Société Française d'Urologie Pédiatrique et de l'Adolescent (S.F.U.P.A.) (Paris, France, juin 2018)

17. *Chimérisme tétragamétique : une cause rare d'infertilité* (A. Hercent, L. Qebibo, S. Heide-Guilhard, B. Keren, G. Quenum-Miraillet, M. Peycelon, E. Amar, S. Chantot-Bastaraud, J.-P. Siffroi) au 24^{ème} colloque de l'Association des Cytogénéticiens de Langue Française (A.C.L.F.) (Saint-Malo, France, septembre 2018) **avec prix du meilleur poster**
18. *Duplication of the bladder, vagina, uterus, ileum, ascending colon, and anorectal malformations: a rare and unusual case report* (M. Peycelon, R. Misseri, K.N. Saad, V. Bidault, L. Ali, A. Paye-Jaouen, A. El-Ghoneimi) lors du Pediatric Urology Workshop (Cincinnati, OH, Etats-Unis, 03/05/2019)
19. *Single nucleotide polymorphism (SNP) array analysis in families of 223 children born with isolated distal hypospadias* (M. Peycelon, F. Frade, S. Chantot-Bastaraud, G. Quenum-Miraillet, C. Hyon, M. Houang, L. Martinerie, A. Paye-Jaouen, C. Grapin-Dagorno, G. Audry, S. Amselem, M. Legendre, A. El Ghoneimi, J.-P. Siffroi) au 30^{ème} Congrès annuel de l'European Society for Paediatric Urology (E.S.P.U.) (Lyon, France, avril 2019) **avec premier prix en basic research**
20. *Duplication of the bladder, vagina, uterus, ileum, ascending colon, and anorectal malformations: a rare and unusual case report* (M. Peycelon, R. Misseri, K.N. Saad, V. Bidault, L. Ali, A. Paye-Jaouen, A. El-Ghoneimi) lors du 2019 Society for Fetal Urology (S.F.U.) Spring Congress meeting (Chicago, IL, États-Unis, 02/05/2019)
21. *Mutations in the DEAH-box RNA Helicase DHX37 are a frequent cause of 46,XY gonadal dysgenesis and 46,XY testicular regression syndrome* (K. McElreavey, A. Jorgensen, C. Eozenou, T. Merel, J. Bignon-Topalovic, D.S. Tan, D. Houzelstein, F. Buonocore, N. Warr, R.G. Kay, M. Peycelon, J.-P. Siffroi, I. Mazen, J.C. Achermann, Y. Shcherbak, J. Leger, A. Sallai, J.-C. Carel, L. Martinerie, R. Le Ru, G.S. Conway, B. Mignot, L. Van Maldergem, R. Bertalan, E. Globa, R. Brauner, R. Jauch, S. Nef, A. Greenfield, A. Bashamboo) au 7^{ème} DSD Symposium (Sao Paulo, Brésil, juillet 2019)

22. *Analyse par puce à ADN de type SNP chez 223 familles d'enfant né avec un hypospadias distal isolé* (M. Peycelon, F. Frade, A. Bloch, S. Chantot-Bastaraud, G. Quenum-Miraillet, C. Hyon, M. Houang, L. Martinerie, A. Paye-Jaouen, C. Grapin-Dagorno, G. Audry, S. Amselem, M. Legendre, A. El Ghoneimi, J.-P. Siffroi) au 76^{ème} Congrès de la Société Française de Chirurgie Pédiatrique (S.F.C.P.) et de la Société Française d'Urologie Pédiatrique et de l'Adolescent (S.F.U.P.A.) (Strasbourg, France, octobre 2019)

23. *Single nucleotide polymorphism (SNP) array analysis in families of 223 children born with isolated distal hypospadias* (M. Peycelon, A. Bloch, F. Frade, H. Morel, S. Chantot-Bastaraud, G. Quenum-Miraillet, T. Blanc, C. Hyon, M. Houang, L. Martinerie, A. Paye-Jaouen, L. Ali, C. Grapin-Dagorno, R. Misseri, G. Audry, S. Amselem, M. Legendre, A. El Ghoneimi, J.-P. Siffroi) au 3^{ème} World Hypospadias Congress (Philadelphie, PA., États-Unis, octobre 2019)

24. *Difficulties in long-term follow-up after surgery for distal hypospadias: a reality that exceeds our expectations* (L.A. Azakpa, L. Ali, M. Peycelon, A. Kallas-Chemaly, G. Enezian, Y. Aigrain, C. Grapin-Dagorno, P. Philippe-Chomette, A. Paye-Jaouen, A. El Ghoneimi) au 3^{ème} World Hypospadias Congress (Philadelphie, PA, États-Unis, octobre 2019)

25. *Detection and treatment for uretral stenosis after surgery for distal hypospadias* (L.A. Azakpa, L. Ali, M. Peycelon, A. Kallas-Chemaly, G. Enezian, Y. Aigrain, C. Grapin-Dagorno, P. Philippe-Chomette, A. Paye-Jaouen, A. El Ghoneimi) au 3^{ème} World Hypospadias Congress (Philadelphie, PA., États-Unis, octobre 2019)

IX. Annexes

Annexe 1. Fiche de recueil du généticien.	221
Annexe 2. Fiche de recueil clinique peropératoire.	222
Annexe 3. Fiche de recueil postopératoire.....	223
Annexe 4. Formulaire d'information et de consentement.....	224
Annexe 5. Principe de la puce à ADN SNP-array Illumina.....	228
Annexe 6. Protocole d'extraction d'ADN de lymphocytes sanguins.....	229
Annexe 7. Protocole d'extraction d'ADN de fibroblastes issus de la culture de biopsie préputiale.	232
Annexe 8. Mode opératoire d'amplification et de séquençage du gène <i>AR</i>	235
Annexe 9. Mode opératoire d'amplification et de séquençage du gène <i>MAMLD1</i>	238
Annexe 10. Mode opératoire d'amplification et de séquençage du gène <i>NR5A1</i>	240
Annexe 11. Alignement protéique interespèces de la protéine <i>AR</i>	242
Annexe 12. Alignement protéique interespèces des trois isoformes de la protéine <i>MAMLD1</i>	244
Annexe 13. Alignement protéique interespèces de la protéine <i>NR5A1</i>	247

Annexe 1. Fiche de recueil du généticien.

PROTOCOLE HYPOSPADIAS Fiche de recueil du généticien

ETIQUETTE
DDN

DATE :
MEDECIN :

Adresse :
Code Postal :
Ville :
Tel :

Age :
Poids :
Taille :

Antécédents :

Anténataux

PN
SA
APGAR
Sexe connu (écho AN)
FIV / ICSI

TN
PC
Prééclampsie (RCIU ?)
Echo AN (rein) normale ?
Jumeaux

Médicaux
Chirurgicaux
Familiaux

Apparentés
Mère prénom
nom

Père prénom
nom

Hypospadias

DDN
Origine géo
G P

DDN
Origine géo

Cancer du testicule
Ectopie testiculaire
Hypofertilité

Poids
Tabac
Ttt
Métier

Taille
Folate

Poids
Tabac
Ttt
Métier

Taille

Traitement préop par T :
Nb injection
Dose

Endocrinologie si bilan

Testostérone
AMH
DHEA

DHT
Inhibine
 $\Delta 4$

LH
17OHP
Autre

FSH
170HPg

Génétique

Caryotype sang

ARBRE GENEALOGIQUE

Annexe 2. Fiche de recueil clinique peropératoire.

PROTOCOLE HYPOSPADIAS

ETIQUETTE

DDN

Adresse :

Code Postal :

Ville :

Tel :

Age de l'enfant :

DATE :

CHIRURGIEN

Examen clinique

Aspect de la verge

Normale / Coudée / Enfouie

Angle couture : °

Taille de la verge

.... cm

Type :.....

(depuis la symphyse pubienne, à angle droit, en traction douce)

Position du méat

Balanique / Balanopréputial /

Pénien ant / Pénien moyen /

Pénoscrotal / Périnéal

Division des corps spongieux

Avant déshabillage

Antérieur / Moyen / Postérieur

Après déshabillage

Antérieur / Moyen / Postérieur

Position des testicules

D : Scrotal / Inguinal / Non

G : Scrotal / Inguinal / Non palpé

Taille des testicules

palpé

G : ... cm

Scrotum

D : ... cm

Prépuce

Plissé / Hypoplasique / Bifide

Tablier de sapeur

Rotation

Normal / Incomplet /

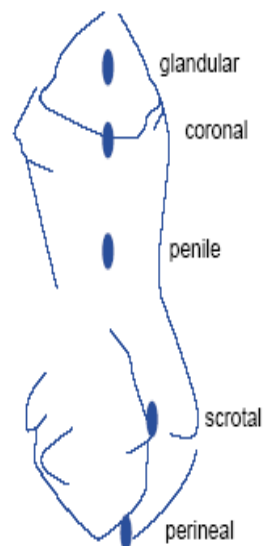
Ventral / Dorsale

Hypoplasique /

Axiale

(.....)

SCHEMA :



Date anesthésie

Date chirurgie

Autorisation

Annexe 3. Fiche de recueil postopératoire.

PROTOCOLE HYPOSPADIAS
Fiche pour le bloc opératoire

Le / /,

Dans le cadre d'un protocole de recherche fondamentale sur la génétique des hypospadias, merci de mettre dans un sac les prélèvements sanguins et tissulaires (un morceau de prépuce dont le bord libre sera marqué d'un fil, disposé dans un tube à pot bleu avec du liquide de conservation RPMI) de l'enfant :

ETIQUETTE

CHIRURGIEN

POIDS

TAILLE

AGE

HDJ / HOSPITALISATION TRADITIONNELLE

TECHNIQUE OPERATOIRE :

TYPE DE PANSEMENT :

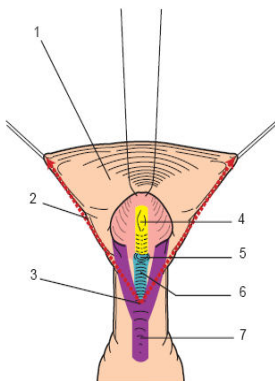
DUREE DU SONDAGE :

ANTIBIOPROPHYLAXIE :

Nom :

Durée :

SCHEMA DE PRELEVEMENT



Annexe 4. Formulaire d'information et de consentement.

<p align="center">Formulaire d'information et consentement d'un patient mineur sur l'utilisation à des fins de recherche scientifique du sérum, plasma, cellules ou tissus prélevés à l'occasion des soins</p>

Madame, Monsieur,

Votre enfant est suivi par le Docteur / Professeur..... consultant(e) à l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris pour une anomalie de l'appareil génital masculin appelée hypospadias.

Cette malformation semble être liée à un défaut d'action des hormones masculines ou androgènes mais les causes exactes l'expliquant restent encore indéterminées, incluant des facteurs vasculaires, endocriniens, environnementaux et génétiques. Aussi, à l'Hôpital Trousseau, un protocole de recherche s'intéresse à étudier une origine génétique à cette anomalie.

Dans le cadre de la prise en charge de votre enfant, les médecins peuvent être amenés pour assurer ses soins à prélever du sang, des cellules ou des tissus qui seront stockés au Laboratoire de Génétique et d'Embryologie Médicales de l'Hôpital Trousseau.

En conséquence, lors de l'intervention de votre enfant sous anesthésie générale, nous vous proposons de réaliser des prélèvements pour une étude génétique qui comprend :

- une prise de sang
- un prélèvement tissulaire d'un morceau du prépuce.

Une partie de ces prélèvements présente un intérêt pour la réalisation d'études scientifiques. Nous souhaiterions pouvoir, avec votre accord, utiliser cette partie dans une finalité de recherche. Bien entendu, l'utilisation de ces prélèvements dans cette finalité ultérieure de recherche n'a aucune conséquence sur les soins qui lui seront prodigués.

Pour leur conservation, les prélèvements, ou le matériel génétique (ADN, ARN) qui en sera extrait, pourront être congelés, qui est une technique performante permettant de les garder de nombreuses années dans de très bonnes conditions de sécurité. La structure chargée de cette mission est le Laboratoire de Génétique et d'Embryologie Médicales de l'Hôpital Trousseau – Assistance Publique – Hôpitaux de Paris. C'est la bibliothèque des prélèvements biologiques.

Lorsque l'utilisation des prélèvements est susceptible de comprendre un examen des caractéristiques génétiques de votre enfant et de vous-mêmes, vous serez informé de la nature et de la finalité de l'examen et votre consentement sera recueilli par écrit préalablement à la réalisation de l'examen.

Les programmes de recherche développés à l'Hôpital Trousseau – Assistance Publique – Hôpitaux de Paris visent à élucider les mécanismes de cette maladie, dans le cadre de programme de recherche financé par l'Université Paris VI et l'INSERM.

Les résultats de ces recherches pourront éventuellement être l'objet de publications dans des revues scientifiques. Votre identité ou celle de votre enfant n'apparaîtra bien sûr pas dans ces publications.

Pour toutes ces raisons, nous souhaitons recueillir votre accord à la réalisation de recherches à partir des prélèvements faits chez votre enfant. Vous pouvez exprimer votre consentement en remplissant le volet de ce document d'information.

Après l'avoir daté et signé, nous vous remercions de le remettre à la fin de votre passage à l'hôpital.

Bien entendu, vous avez toujours la possibilité de revenir sur votre accord, sans avoir à expliquer les raisons ; il vous suffit de nous le faire savoir.

Vous pouvez exprimer votre refus de la même manière.

Si vous ne nous remettez pas ce document, votre absence de réponse sera considérée comme un refus, et vos prélèvements ne pourront pas être utilisés dans le cadre de recherches.

Pour toute recherche, il est également nécessaire de disposer des données cliniques concernant votre enfant et vous-mêmes. Comme vous le savez, celles-ci sont conservées dans le dossier médical de votre enfant et gérées informatiquement ; le traitement automatisé des informations vous concernant a été autorisé par la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés.

De même qu'une partie des prélèvements est utile pour la recherche scientifique, les données médicales fournissent les informations nécessaires pour mener à bien les travaux effectués sur les prélèvements. Les nouvelles connaissances sur les maladies sont le plus souvent produites grâce au rapprochement des résultats d'analyses biologiques avec les observations cliniques des maladies et de leur évolution.

Vous pouvez vous opposer à l'utilisation des données médicales concernant votre enfant à des fins de recherche, en exprimant votre refus. Si vous exprimez votre refus, ces données médicales ne seront utilisées dans aucune recherche nécessitant leur analyse. Bien entendu, vous n'avez pas à expliquer les raisons de ce choix.

Dans l'hypothèse où vous n'avez pas exprimé de refus, et si les données médicales sont utilisées dans le cadre d'un projet scientifique, elles seront rendues anonymes avant leur utilisation.

Lorsque vous aurez remis ce document, vos choix sur votre accord ou votre opposition à l'utilisation du surplus de matériel biologique et des informations médicales à des fins de recherche, seront insérés dans votre dossier médical.

Seront donc indiqués, selon les cas, votre accord ou votre refus pour l'utilisation d'une partie des prélèvements faits chez votre enfant ainsi qu'un éventuel refus pour l'utilisation de ses données médicales.

Madame, Monsieur,

Quelle que soit votre décision, nous tenons à vous remercier de l'attention que vous avez portée à la lecture de ce document.

Si les explications qui vous ont été fournies vous semblent insuffisantes, ou si vous souhaitez obtenir des informations supplémentaires vous pouvez vous adresser au médecin qui va prendre votre enfant en charge, par courriel ou par courrier en nous écrivant au :

**Laboratoire de Génétique et d'Embryologie Médicales
Hôpital Trousseau / Assistance Publique - Hôpitaux de Paris
26, Avenue du Docteur Arnold Netter
75571 Paris Cedex 12**

Note importante :

Ce document écrit vient en complément d'une information orale qui doit vous être fournie par un médecin au cours d'un entretien particulier.

- **Joindre l'original de ce document au prélèvement,**
- **Conserver le feuillet n°2 dans le dossier médical,**
- **Remettre le feuillet n°3 au patient.**

Etiquette du patient à coller sur les 3 feuilles	Partie réservée au Laboratoire
Nom marital :	Numéro d'inscription :
Nom patronymique :	
Prénom :	
Date de naissance :	

CONSENTEMENT

Je soussigné(e)
avoir pris connaissance du document m'informant que le laboratoire de Génétique et
d'Embryologie Médicales de l'Hôpital Trousseau – Assistance Publique – Hôpitaux de Paris a
pour mission de conserver le sérum, plasma, les cellules et les tissus prélevés lors de des soins
prodigués à mon enfant.....
et que ces prélèvements peuvent être utilisés à la réalisation de recherches de nature
scientifique.

Je considère disposer des informations qui me permettent de décider

- Je donne mon accord pour que des prélèvements biologiques soient utilisés à des fins
de recherche, y compris de recherche sur leurs caractéristiques génétiques.
- Je m'oppose à ce que les prélèvements biologiques soient utilisés à des fins de
recherche.

Je sais que ma décision n'est pas irrévocable et que je peux donc à tout moment revenir sur ma
décision de retirer ou donner mon consentement.

J'ai également été informé(e) du fait que les données médicales anonymisées me concernant
seront transmises aux chercheurs qui travaillent sur les prélèvements biologiques.
Ces informations sont confidentielles et ne seront partagées qu'au sein du corps médical.
Sur le principe, je ne m'oppose pas à leur traitement.

PATIENT

Fait à :
Le/...../.....
Nom, prénom :

Nom, prénom du père :
Signature

Nom, prénom de la mère :
Signature

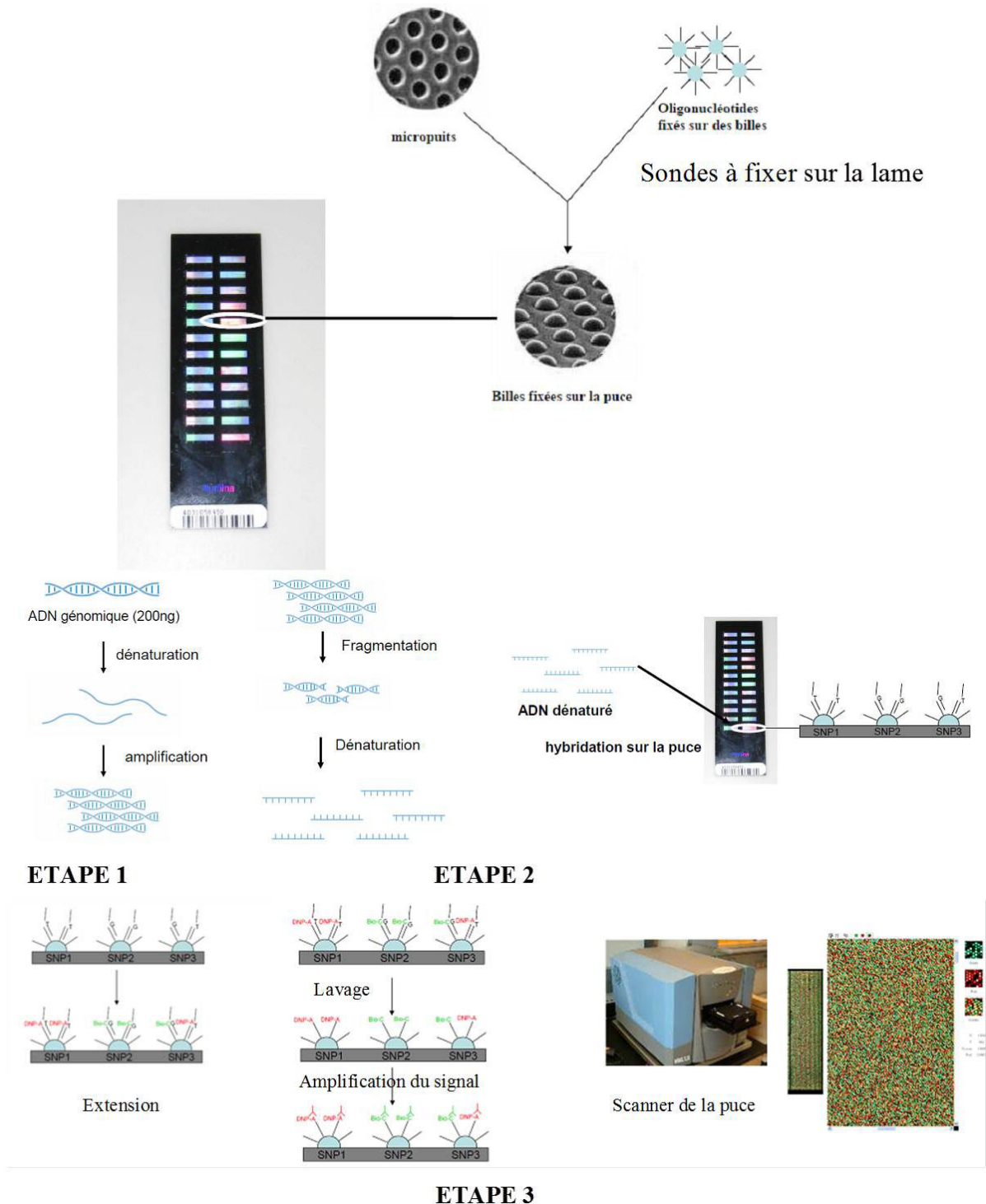
MEDECIN

Fait à :
Le/...../.....
Nom, prénom :

Signature et tampon du service

Annexe 5. Principe de la puce à ADN SNP-array Illumina.

Étape 1 : dénaturation et amplification de l'ADN génomique ; étape 2 : fragmentation enzymatique et dénaturation de l'ADN amplifié ; étape 3 : extension de chaque sonde oligonucléotidique par un dinucléotide marqué, lavage, amplification du signal et analyse de la puce



Annexe 6. Protocole d'extraction d'ADN de lymphocytes sanguins.

Description

Matériel :

Centrifugeuse pour tubes de 50mL
 Agitateur rotatif
 Vortex
 Bain marie
 Etuve à 37° OU Bain marie à 37° à sec
 Oses
 Tubes de 1.5mL
 Tubes de 2mL
 Micropipettes et cônes adaptés
 Pipetteur automatique
 Pipettes de 5mL et 25 mL

Produits

Kit QIAGENE Flexigène 250 (réf. :51204)
 Isopropanol2–propanol pour BM à99% (armoie produits chimiques)
 Alcool à 70°(congélateur pièce extraction)

**EXTRACTION D'ADN A PARTIR DE SANG TOTAL
 PRELEVE SUR EDTA**

Méthode FLEXIGEN (Qiagen réf. 51204 kit 250 U)

Volume de sang	1,5mL	2mL	3mL	4 mL	5mL	6mL
Réactifs						
Tampon FG 1	3mL	5mL	7,5mL	10mL	12,5mL	15mL
Réactif dénaturant : FG2 + Qiagen	1mL	1mL	1,5mL	2mL	2,5mL	3mL
Isopropanol pur	1mL	1mL	1,5mL	2mL	2,5mL	3mL
Ethanol 70%froid (-20°C)	1mL	1mL	1,5mL	2mL	2,5mL	3mL
Buffer FG3	<u>200 µL</u>	<u>200µL</u>	<u>300µl</u>	<u>400µL</u>	<u>500µL</u>	<u>600µL</u>

A - LYSE DES GLOBULES ROUGES

De préférence le faire le jour même du prélèvement

Allumer la centrifugeuse à 4°C

- Verser le sang dans un corning de 50 mL identifié (nom, prénom et date de naissance)
- Noter le volume sur le tube et sur le cahier de réception (conserver 1 mL de sang au cas où il y ait un problème - stocké le tube de prélèvement dans bac à légumes frigo pièce extraction)
- Rajouter le Tampon FG 1 (cf. tableau)
- Agiter par retournement pendant 5 mn à température ambiante sur l'agitateur rotatif
- Centrifuger à 4000 rpm pendant 10 mn à 4 °C (un petit culot blanc se colle sur le côté du tube)
- Vider le surnageant par retournement dans un récipient contenant de l'eau de javel et éliminer l'excédent de FG en gardant le tube retourné sur un papier absorbant (veiller à l'adhérence du culot au fond du tube)
- Conserver le culot à -20°C (les tubes sont stockés afin de réaliser la lyse des globules blancs en série)

B – LYSE DES GLOBULES BLANCS

- Allumer le bain-marie à 65°C
- Préparation extemporanée du réactif dénaturant (conservation 1 H à température ambiante)

Ex : pour 1 mL de FG2 rajouter 8 µl de Qiagen protéase

Calculer la quantité de réactif dénaturant à préparer (en fonction du tableau)

Préparation de la protéase

Dans placard, prendre dans la boîte du kit(250) un flacon de protéase

- Ajouter 1,4 mL de FG3
- Agiter
- Repartir dans µtube ≈200µl / tube = 7 tubes

Noté : protéase Qiagen + date

Conserver à l'abri de la lumière à 4°C (boîte métallique au frigidaire pièce extraction)

Faire tube après tube

- Vortexer le tube **avant et immédiatement après** l'ajout du réactif pour dissocier l'agrégat de cellules
- Incuber à 65°C pendant 15 mn au bain-marie (vortexer chaque tube à ½ temps)
- Une coloration verdâtre apparaît et la solution doit être limpide. (si il reste des cellules en suspension : rajouter 1 mL de réactif dénaturant et remettre 10 mn à 65°C)

Pendant l'incubation, préparer pour chaque patient un tube de stockage de l'ADN « transparent » avec une couleur de bouchon correspondante à l'examen demandé
Vert = ADN Jaune = CGH Violet = MLPA

Noter sur le tube :

Nom, prénom, date de naissance, date du jour, examen demandé, et en dessous .../ x00 µL de FG 3. Entouré l'ensemble du tube de scotch transparent.

Noter le nom du patient sur le bouchon et la lettre de l'initial du prénom si besoin.

C - PRECIPITATION DE L'ADN

- Ajouter l'isopropanol pur (cf. tableau) – stocké dans un tube dans le placard à température ambiante (réserve dans armoire à produits chimiques au nom : 2-propanol for MB > 99%)
- Agiter lentement par retournement jusqu'à formation de la méduse
- Récupérer la méduse à l'aide d'une pipette boutonnée. L'essorer au maximum sur la paroi du tube sans la perdre.
- Rincer la méduse par un passage dans un volume (cf. tableau) d'éthanol 70% froid
- L'essorer au maximum sur la paroi du tube.
- Laisser sécher la méduse à l'air en retournant la pipette dans le tube de 50 mL identifié.
- Reprendre la méduse dans tampon FG 3 (cf. tableau) dans le tube de stockage « transparent » de l'ADN étiqueté avec le nom et le prénom du patient, en coupant le bout de la pipette boutonnée.
- Incuber pendant 2 H minimum les tubes dans bain-marie à 65°C

Placer les tubes dans un gros tube bleu (environ 3 petits tubes/tube bleu) et mettre sur l'agitateur rotatif pendant toute la nuit.

D- DOSAGE DE L'ADN

- Le lendemain matin, doser les échantillons au Nanodrop. Voir annexe « dosage au Nanodrop »

Si les chiffres de concentration et les rapports sont corrects

- Ecrire sur le tube la concentration mesurée
- la position du tube dans la boîte de rangement.
- Rentrer les données sur l'ordinateur
 - Icône : patient CGH-MLPA
 - Choisir le dernier dossier : patient CGH Array MLPA de la date la plus récente.

Ranger les tubes dans la boîte ADN suivant l'emplacement du tableau et les stocker à 4°C.

Annexe 7. Protocole d'extraction d'ADN de fibroblastes issus de la culture de biopsie préputiale.

Description

Matériel

A température ambiante

Micropipettes et cônes adaptés

Microtubes de 1,5 ml

Tubes de 15 ml

Bain-marie

Centrifugeuse réfrigérée

Hotte chimique pour CMR

Conservation à +4°

Phénol

Conservation à -20°

Protéinase K 10 mg/ml (aliquots)

Ethanol absolu, éthanol à 70%

Réactifs

Conservation à température ambiante

Acétate de Na 3M ph 8

PBS x1

Sds 10%

Tris hcl 2M ph 7,5

Edta 0.25M ph 8

Nacl 5M

Eau distillée stérile

Chloroforme Ready red

FG3 OU TE

Préparation des réactifs

-Tampon STE conservé à +4° (aliquotage en tubes de 15 ml)

	Volume (ml)	Concentration finale
NaCl 5M	1	100mM
Tris HCl 2M ph :7.5	1,25	50mM
EDTA 0,25 M ph :8	0,2	1mM
H2O qsp	50ml	

Mode opératoire

Allumer le bain-marie le faire chauffer à 56° et décongeler les culots secs en les laissant à température ambiante quelques minutes.

1. Préparation du culot cellulaire

Mettre quelques ml de pbs sur le culot sec pour le remettre en suspension.

Récupérer le mélange et le transvaser dans un tube de 15ml identifié.

Rincer le tube ayant contenu le culot sec avec du pbs et transvaser également dans le tube de 15ml

Compléter le tube avec du pbs pour avoir environ 12ml de pbs +cellules.

Centrifuger le tube à 4000t/mn pendant 10 mn.

Retirer le surnageant à la pastette ou par retournement (attention à ne pas perdre le culot)

Lyse des cellules

- ❖ **Si le culot est volumineux et bien visible**
- ❖ Ajouter 600 µl de tampon STE, bien dissocier le culot cellulaire.
- ❖ Puis ajouter

	Volume (µl)	Concentration finale
Protéinase K à 10mg/ml	12	200µg/ml
SDS 10 %	30	0,5%

- ❖ Incuber 3 heure minimum au bain marie à 56°(il ne doit plus rester de morceaux en suspension le lysat doit être limpide) si insuffisant possibilité de laisser sur la nuit
- ❖ Transférer la totalité du culot dans un tube de 2ml.
- ❖ **Si le culot est de petit volume**, diviser les proportions de tous les réactifs par 2 pour ne pas trop diluer l'ADN.

2. Extraction au phénol chloroforme.

- ❖ Préparer 4 tubes identifiés de 2ml par patients
- ❖ **Sous la hotte chimique** rincer le tube de 15 ml avec 640µl de phénol et verser le produit de rinçage dans le tube de 2 ml contenant le lysat
- ❖ Agiter vigoureusement le mélange lysat+phénol
- ❖ Centrifuger à 12000 rpm pendant 5 mn

- ❖ Prélever le surnageant (phase aqueuse supérieure) et le mettre dans un autre tube propre de 2 ml
- ❖ Rajouter le même volume de solution de phénol, agiter, centrifuger
- ❖ Récupérer la phase supérieure Rajouter 600µl (volume à volume) de chloroforme, agiter fortement, centrifuger.
- ❖ Renouveler la même opération une fois.
- ❖ Récupérer le surnageant dans un nouveau tube identifié.

3. Précipitation de l'ADN à l'acétate de Na

On obtient environ donc 600µl de solution aqueuse

- ❖ Ajouter 60µl d'acétate de Na
- ❖ Ajouter 1500µl (2,5x le volume) d'éthanol absolu
- ❖ Agiter le tube pour voir apparaître la méduse
- ❖ Récupérer la méduse et la rincer dans de l'éthanol à 70% puis la laisser sécher.
- ❖ Si la méduse n'est pas visible
 - Mettre à -20° pendant au moins 2 h voir toute la nuit
 - Centrifuger le tube à 14000t/mn pendant 30mn à 4°
 - On doit voir un culot blanc dans le fond du tube (repérer la position du tube pour voir où se trouve le culot)
 - Si le culot est présent vider le surnageant rajouter 200µl d'éthanol à 70%
 - Centrifuger à 14000 t/mn pendant 5 mn.
 - Vider le surnageant et laisser sécher le culot en position renversée.
- ❖ Reprendre la méduse ou le culot avec du FG3 entre 100 et 200 µl en fonction de la grosseur du culot
- ❖ Si le culot n'est pas visible ou très petit remettre à – 20° pendant quelques heures et refaire une centrifugation à 14000 t/mn pendant 30 mn continuer comme précédemment.
- ❖ **Dosage de l'ADN** au nanodrop 2000c (Cf. protocole)

Annexe 8. Mode opératoire d'amplification et de séquençage du gène AR.

DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE

1) AMPLIFICATION PAR PCR

- Amorces utilisées :

Exon	Nom des amorces*	Séquence 5'-3'	Orientation	Taille de l'amplicon (pb)
Exon 1.1	AR_ex1.1_PCR_F	CCGTGTGTCTTCTTCTGCAC	sens	943
	AR_ex1.1_PCR_R	GACACCGACACTGCCTTACA	antisens	
Exon 1.2	AR_ex1.2_PCR_F	AGAGAGGTTGCGTCCCAGAG	sens	903
	AR_ex1.2_PCR_R	CTGAGGGTGACCCAGAACC	antisens	
Exon 1.3	AR_ex1.3_PCR_F	AAAGGGCTAGAAGGCGAGAG	sens	907
	AR_ex1.3_PCR_R	TGGGGGAGTTGAAGAATCTG	antisens	
Exon 2	AR_ex2_PCR_F	TCTCCCTTTGGATGAGGTAA	sens	871
	AR_ex2_PCR_R	TTTTTCCTTTACTAGCCAGCAG	antisens	
Exon 3	AR_ex3_PCR_F	GCACCTTATTTTAAAACCATTGA	sens	671
	AR_ex3_PCR_R	CTCACCTTCTGTTGGCTCCT	antisens	
Exon 4	AR_ex4_PCR_F	TCAGAGTTTTCTCTGCAAGC	sens	813
	AR_ex4_PCR_R	TGTGATTAATGGAAAATTTGCTG	antisens	
Exon 5	AR_ex5_PCR_F	CTTAATGGCCAGCCTGGAT	sens	659
	AR_ex5_PCR_R	AGCCTTTGGTGGTAGCAAAA	antisens	
Exon 6	AR_ex6_PCR_F	CCCTGACTCAGAAAACAGAAGG	sens	653
	AR_ex6_PCR_R	GATGGAGGTTGACTTCTAGCAAAA	antisens	
Exon 7	AR_ex7_PCR_F	CAGATCGGATCCAGCTATCC	sens	614
	AR_ex7_PCR_R	CATCTGCTGCAAGTCCCTTC	antisens	
Exon 8	AR_ex8_PCR_F	GACCTCATGGGGGAGGAC	sens	503
	AR_ex8_PCR_R	GGGAGGGAAGAAGAAAAGAA	antisens	

* les solutions mères des amorces à 100 pmol/μl et les dilutions à 5 pmol/μl sont conservées à -20°C dans le congélateur P0/C1

- Mix réactionnel :

1) **Exons 1.1 et 1.3** : mix Gotaq avec DMSO

ATTENTION, PCR à préparer en double pour 1.1 et en triple pour 1.3

Réactif	Concentration	Volume (μl)
Mix Gotaq	2X	10
Amorce sens AR-Exn_PCR_F	5 pmol/μl	0,9
Amorce antisens AR-Exn_PCR_R	5 pmol/μl	0,9
H ₂ O		qsp 20 μl soit 5,2
ADN	50 ng/μl	2 μl soit 100 ng
DMSO		1

2) **Exons 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8**: mix Gotaq

Réactif	Concentration	Volume (µl)
Mix Gotaq	2X	10
Amorce sens AR-Exn_PCR_F	5 pmol/µl	0,9
Amorce antisens AR-Exn_PCR_R	5 pmol/µl	0,9
H ₂ O		qsp 20 µl soit 6,2
ADN	50 ng/µl	2 µl soit 100 ng

3) **Exon 1.2** : mix Gotaq à **62°C**

Réactif	Concentration	Volume (µl)
Mix Gotaq	2X	10
Amorce sens AR-Ex1.2_PCR_F	5 pmol/µl	0,9
Amorce antisens AR-Ex1.2_PCR_R	5 pmol/µl	0,9
H ₂ O		qsp 20 µl soit 4,7
ADN	50 ng/µl	2 µl soit 100 ng

- Conditions d'amplification :

1) **Exons 1.1, 1.3, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8**

Température	Durée	
94°C	5 min	} 35 cycles
94°C	30 s	
58°C	30 s	
72°C	45 s	
72°C	7 min	
10°C	∞	

2) **Exons 1.2** :

Température	Durée	
94°C	5 min	} 35 cycles
94°C	30 s	
62°C	30 s	
72°C	45 s	
72°C	7 min	
10°C	∞	

- Vérification des PCR :

Déposer 5µl de chaque PCR sur un gel d'agarose 1% (cf. protocole « préparation d'un gel d'agarose ») avec un marqueur de taille en début de gel (2µL Kb+ et 5µL de bleu)

2) SEQUENCAGE

- Amorces de séquences utilisées :

Exon	Nom des amorces*	Orientation	Séquence 5'-3'
Exon 1.1	AR_ex1.1_SEQ_F	sens	cgccaagtttccttctctgga
	AR_ex1.1_SEQ_R	antisens	ttcggatactgcttctctgct
Exon 1.1	AR_ex1.1_PCR_F	sens	ccgtgtgtcttctctgcac
	AR_ex1.1_PCR_R	antisens	gacaccgacactgccttaca
Exon 1.2	AR_ex1.2_SEQ_F	sens	tgctccgctgacctaaaga
	AR_ex1.2_SEQ_R	antisens	ccagagccagtggaaggtg
Exon 1.3	AR_ex1.3_SEQ_F	sens	gaactgccgtctaccctgtc
	AR_ex1.3_SEQ_R	antisens	caggggcaatctgagtgttc
Exon 1.3	AR_ex1.3_PCR_F	sens	aaagggctagaaggcgagag
	AR_ex1.3_PCR_R	antisens	tgggggagttgaagaatctg
Exon 1.3	AR_ex1.3_F2	sens	tctacaagtccggagcactg
	AR_ex1.3_R2	antisens	ctaggtttaccctgctgagc
Exon 2	AR_ex2_SEQ_F	sens	ggctaataccagagaacttcc
	AR_ex2_SEQ_R	antisens	agctgggaccaccttact
Exon 3	AR_ex3_SEQ_F	sens	aacaccaatggaaatcaacaa
	AR_ex3_SEQ_R	antisens	ttgcctatgaaagggtcagc
Exon 4	AR_ex4_SEQ_F	sens	gcaggtatttgggatgatgaa
	AR_ex4_SEQ_R	antisens	tgaaagcatgactgctgtgc
Exon 5	AR_ex5_SEQ_F	sens	cttaggggatgcccgaatac
	AR_ex5_SEQ_R	antisens	ccaagaaactccagccctta
Exon 6	AR_ex6_SEQ_F	sens	tctggccagagaagatgag
	AR_ex6_SEQ_R	antisens	ggagggggaatgaagaagg
Exon 7	AR_ex7_SEQ_F	sens	ccaagcacacagacttcaa
	AR_ex7_SEQ_R	antisens	cctccacccttccacaata
Exon 8	AR_ex8_SEQ_F	sens	gaagggggaggaacaaaag
	AR_ex8_SEQ_R	antisens	cccagcaaatagaattcagga

* les solutions mères des amorces à 100 pmol/µl et les dilutions à 5 pmol/µl sont conservées à -20°C dans le congélateur P0/C1

Surveillance

Afin d'effectuer un contrôle qualité interne de PCR, il est impératif d'avoir un témoin négatif sans ADN.

Annexe 9. Mode opératoire d'amplification et de séquençage du gène *MAMLD1*.

DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE

1) AMPLIFICATION PAR PCR

- Amorces utilisées :

Exon	Nom des amorces*	Séquence 5'-3'	Orientation	Taille de l'amplicon (pb)
Exon 1	MAMLD1_ex1_PCR_F	CCACCCCTCTACCTTCCAGT	sens	715
	MAMLD1_ex1_PCR_R	TCGTCTTCCCTCTCTCATCC	antisens	
Exon 2	MAMLD1_ex2_PCR_F	GCACAGCTCATTGACCAGA	sens	592
	MAMLD1_ex2_PCR_R	GGCTAACAAGCCCAAATCA	antisens	
Exon 3.1	MAMLD1_ex3.1_PCR_F	GCACTATGGTTCCAAAGACAGG	sens	825
	MAMLD1_ex3.1_PCR_R	AAGCAAACCTCTTGCTGGAA	antisens	
Exon 3.2	MAMLD1_ex3.2_PCR_F	AGGGCCCACTGTTCTTACT	sens	965
	MAMLD1_ex3.2_PCR_R	AACACTGTGGGGTGAAGGAC	antisens	
Exon 3.3	MAMLD1_ex3.3_PCR_F	CATGACGTCCAGCAGCAAT	sens	997
	MAMLD1_ex3.3_PCR_R	GTGCAGCTCTCCTTCTAGGG	antisens	
Exon 4	MAMLD1_ex4_PCR_F	CCAGGTTTCCTGGAGCATAA	sens	495
	MAMLD1_ex4_PCR_R	GGAGCTTGACTGTTCCGGTCT	antisens	
Exon 5	MAMLD1_ex5_PCR_F	GGCTTGGTCAAAGTCATTGC	sens	978
	MAMLD1_ex5_PCR_R	AGGCATACAGCTGAGGGAGA	antisens	
Exon 6	MAMLD1_ex6_PCR_F	ATGCATGCGAGTGTATGCTG	sens	420
	MAMLD1_ex6_PCR_R	GAGTCATTTAGACCAGGCCTTC	antisens	

* les solutions mères des amorces à 100 pmol/μl et les dilutions à 5 pmol/μl sont conservées à -20°C dans le congélateur P0/C1

- Mix réactionnel :

1) **Exons 1, 2, 3.1, 3.2, 3.3, 4, 5 et 6** : mix Gotaq

Réactif	Concentration	Volume (μl)
Mix Gotaq	2X	10
Amorce sens MAMLD1-Exn_PCR_F	5 pmol/μl	0,9
Amorce antisens MAMLD1-Exn_PCR-R	5 pmol/μl	0,9
H ₂ O		qsp 20 μl soit 6,2
ADN	50 ng/μl	2 μl soit 100 ng

- Conditions d'amplification :

Température	Durée
94°C	5 min
94°C	30 s
58°C	30 s
72°C	45 s
72°C	7 min
10°C	∞

} 35 cycles

- Vérification des PCR :

Déposer 5µl de chaque PCR sur un gel d'agarose 1% (cf. protocole « préparation d'un gel d'agarose ») avec un marqueur de taille en début de gel (2µL Kb+ et 5µL de bleu)

2) SEQUENCAGE

- Amorces de séquences utilisées :

Exon	Nom des amorces*	Orientation	Séquence 5'-3'
Exon 1	MAMLD1_ex1_SEQ_F	Sens	ctcacaataatgcccctcat
	MAMLD1_ex1_SEQ_R	Antisens	tgggaggctatatggaacctt
Exon 2	MAMLD1_ex2_SEQ_F	Sens	cctttctcgatccaacaggt
	MAMLD1_ex2_SEQ_R	Antisens	cgggcagagatcatttaagc
Exon 3.1	MAMLD1_ex3.1_PCR_R	Antisens	Aagcaaactccttgctggaa
	MAMLD1_ex3.1_SEQ_R	Antisens	aggcttgggagttgtgctta
Exon 3.2	MAMLD1_ex3.2_SEQ_F	Sens	accaggagcttcaagagctg
	MAMLD1_ex3.2_SEQ_R	Antisens	aagcctgggctagagagctt
Exon 3.3	MAMLD1_ex3.3_SEQ_F	Sens	tcaaaaccctcaaggacac
	MAMLD1_ex3.3_SEQ_R	Antisens	tttcagagtctttccagtctca
Exon 4	MAMLD1_ex4_SEQ_F	Sens	cttgacaccagggagttggt
	MAMLD1_ex4_SEQ_R	Antisens	atgatttgcatgacccaat
Exon 5	MAMLD1_ex5_SEQ_F	Sens	ccaagcagttgggtgggtat
	MAMLD1_ex5_SEQ_R	Antisens	actctgcttgctgggtgt
Exon 6	MAMLD1_ex6_SEQ_F	Sens	attcatgcttctgctgcac
	MAMLD1_ex6_SEQ_R	Antisens	ctcaatgcttccagaagcaca

* les solutions mères des amorces à 100 pmol/µl et les dilutions à 5 pmol/µl sont conservées à -20°C dans le congélateur P0/C1

Surveillance

Afin d'effectuer un contrôle qualité interne de PCR, il est impératif d'avoir un témoin négatif sans ADN.

Annexe 10. Mode opératoire d'amplification et de séquençage du gène *NR5A1*.

DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE

1) AMPLIFICATION PAR PCR

- Amorces utilisées :

Exon	Nom des amorces*	Séquence 5'-3'	Orientation	Taille de l'amplicon (pb)
Exon 2-3	NR5A1_ex2-3_PCR_F	AGACAAACGAATCCCAATCG	sens	901
	NR5A1_ex2-3_PCR_R	GGCTGGGGAAAGAGTCATCT	antisens	
Exon 4.1	NR5A1_ex4.1_PCR_F	GGTGTTTCAGCAAGCACAAGA	sens	741
	NR5A1_ex4.1_PCR_R	AGAGAAGGGCTCTGGGTAGC	antisens	
Exon 4.2	NR5A1_ex4.2_PCR_F	AGTTTGGGCCGATGTACAAG	sens	768
	NR5A1_ex4.2_PCR_R	GACCCAGGAGGCTGTGATAA	antisens	
Exon 5	NR5A1_ex5_PCR_F	AACTGGCCAGACCTCTGTTG	sens	565
	NR5A1_ex5_PCR_R	CATGAGCCTCTCCTCACCAT	antisens	
Exon 6	NR5A1_ex6_PCR_F	GGGGTTTGTGTGTGAAGGAG	sens	686
	NR5A1_ex6_PCR_R	AGGATGGGAGCCTGGAATAA	antisens	
Exon 7	NR5A1_ex7_PCR_F	CAATGCCCATGTCTTTGATG	sens	632
	NR5A1_ex7_PCR_R	GGTTAACAGCCACCTCCTTG	antisens	

* les solutions mères des amorces à 100 pmol/μl et les dilutions à 5 pmol/μl sont conservées à -20°C dans le congélateur P0/C1

- Mix réactionnel :

1) **Exon 2-3** : mix Gotaq avec 5% de DMSO

Réactif	Concentration	Volume (μl)
Mix Gotaq	2X	10
Amorce sens NR5A1-Ex2-3_PCR_F	5 pmol/μl	0,9
Amorce antisens NR5A1-Ex2-3_PCR-R	5 pmol/μl	0,9
H ₂ O		qsp 20 μl soit 5,2
DMSO		1
ADN	50 ng/μl	2 μl soit 200 ng

2) **Exons 4.1, 4.2, 5, 6 et 7** : mix Gotaq sans DMSO

Réactif	Concentration	Volume (μl)
Mix Gotaq	2X	10
Amorce sens NR5A1-Exn_PCR_F	5 pmol/μl	0,9
Amorce antisens NR5A1-Exn_PCR-R	5 pmol/μl	0,9
H ₂ O		qsp 50 μl soit 6,2
ADN	50 ng/μl	2 μl soit 200 ng

- Conditions d'amplification :

Température	Durée
94°C	5 min
94°C	30 s
58°C	30 s
72°C	45 s
72°C	7 min
10°C	∞

} 35 cycles

- Vérification des PCR :

Déposer 5µl de chaque PCR sur un gel d'agarose 1% (cf. protocole « préparation d'un gel d'agarose ») avec un marqueur de taille en début de gel (2µL Kb+ et 5µL de bleu)

2) SEQUENCAGE

- Amorces de séquences utilisées :

Exon	Nom des amorces*	Orientation	Séquence 5'-3'
Exon 2-3	NR5A1_ex2-3_SEQ_F	Sens	gggcacagagaggggattac
	NR5A1_ex2-3_SEQ_R	Antisens	gttctcttcagcgactgg
Exon 4.1	NR5A1_ex4.1_SEQ_F	Sens	tggaggaggaaggagatgtg
	NR5A1_ex4.1_SEQ_R	Antisens	cataaggctccgggtactca
Exon 4.2	NR5A1_ex4.2_SEQ_F	Sens	gccctgaaacagcagaagaa
	NR5A1_ex4.2_SEQ_R	Antisens	aaggatggccctatccaaag
Exon 5	NR5A1_ex5_SEQ_F	Sens	atctgggtagatgggcacag
	NR5A1_ex5_SEQ_R	Antisens	gtggggaaagggctgataat
Exon 6	NR5A1_ex6_SEQ_F	Sens	ggttgaggagagctcggaag
	NR5A1_ex6_SEQ_R	Antisens	tgagtaagggaggggtcctt
Exon 7	NR5A1_ex7_SEQ_F	Sens	aggaaggtggtattggtga
	NR5A1_ex7_SEQ_R	Antisens	tcccaaacacacagtgtcaga

* les solutions mères des amorces à 100 pmol/µl et les dilutions à 5 pmol/µl sont conservées à -20°C dans le congélateur P0/C1

Surveillance

Afin d'effectuer un contrôle qualité interne de PCR, il est impératif d'avoir un témoin négatif sans ADN.

Annexe 11. Aligement protéique interespèces de la protéine AR.

```

Homo_sapiens      MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRGAFQNLFSVREVIQNPGRHPPEAASAAPPASLLLLQQQ 60
Canis_lupus      MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRGAFQNLFSVREVIQNPGRHPPEAVSAAPPGA----- 52
Bos_taurus      MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRGAFQNLFSVCEVIQNPGRHPPEASSAAPS----- 52
Mus_musculus    MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRGAFQNLFSVREAIQNPGRHPPEAANIAPPGA----- 52
Rattus_norvegicus MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRGAFQNLFSVREAIQNPGRHPPEAASIAAPPGA----- 52
Gallus_gallus   MEVQLGIGRVYPRPPGRFRGVFQTFQSVCEAFQAP--RDEPGGPLPAPGA----- 50
*****:*****.:*:*.**:***** *:* * * . . . .**

Homo_sapiens      QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQETSFRQQQQQQG--EDGSPQAHRRGPTGYLVLDDEEQPSQ 118
Canis_lupus      -----HLQQQQQQQQQQETSFRQQQQQQG--GDDGSPQAQSRGPTGYLALDEEQPSQ 103
Bos_taurus      -----RLQQQ-----QETSFRQQQQQQQREDGSPQVQSRGPTGYLALDEEQPSQ 98
Mus_musculus    -----CLQQR-----QETSFRRRRRRQGH--TEDGSPQAHIRGPTGYLALDEEQPSQ 97
Rattus_norvegicus -----CLQQR-----QETSFRRRRRRQGH--PEDGSPQAHIRGPTGYLALDEEQPSQ 97
Gallus_gallus   -----PCPQ-----SRPPPPVASPAFLPL----- 69
          ..*:          **:          . . . .:* *

Homo_sapiens      PQSALECHPERGCVPEGAAVAASKGLFQQLPAPPDEDDSAAPSTLSLLGPTFFGLSSCS 178
Canis_lupus      QRSASKGHPESACVPEPGVTSATGKGLQQQPAPPDENDSAAPSTLSLLGPTFFGLSSCS 163
Bos_taurus      HHSAPLEGHPESGCVPEPRAASAAGKGLQQPPAPLDEDDSAAPSTLSLLGPTFFGLSSCS 158
Mus_musculus    QQAASEGHPESSCLPEPGAATAPGKGLFQQPPAPPDQDDSAAPSTLSLLGPTFFGLSSCS 157
Rattus_norvegicus QQSASEGHPESSCLPEPGAATAPGKGLFQQPPAPPDQDDSAAPSTLSLLGPTFFGLSSCS 157
Gallus_gallus   -----PEPRAARP-----AMGSPFP----CA 87
          *** .: .          :*..**          *:

Homo_sapiens      ADLKDILSEASTMQLLQQQ-----QQEAVSEGSSSGRAREASGAPTS 220
Canis_lupus      TDLKDILSEAGTMQLLQQQRQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEVVSEGSSSGRAREAAGASTS 223
Bos_taurus      TDLKDILSEAGTMQLLQQQ-----QQQQQEAVSEGSS--GRAREATGAPIS 202
Mus_musculus    ADIKDILNEAGTMQLLQQQ--QQQQQHQQHQHQHQ--EVISEGSS--ARAREATGAPSS 213
Rattus_norvegicus ADIKDILSEAGTMQLLQQQ--QQQQQQQQQQQQQQQQQQQEVISEGSSVRAREATGAPSS 216
Gallus_gallus   GDLKELLGEPGVLPLLPE-----AEPGAGRAEPA 117
          *:*:*.*. . . .: ** :          * * :

Homo_sapiens      SKDNYLGGTSTISDNAKELCKAVSVSMGLGVEALEHLSPEQLRGDCMYAPLLGVPPAVR 280
Canis_lupus      SKDSYLGGSTISDSAKELCKAVSVSMGLGVEALEHLSPEQLRGDCMYAPLLGGPPAVR 283
Bos_taurus      SKDSYLGGSTISDSAKELCKAVSVSMGLGVEALEHLSPEQLRGDCMYAPLLGPPAVR 262
Mus_musculus    SKDSYLGGNSTISDSAKELCKAVSVSMGLGVEALEHLSPEQLRGDCMYASLLGGPPAVR 273
Rattus_norvegicus SKDSYLGGNSTISDSAKELCKAVSVSMGLGVEALEHLSPEQLRGDCMYASLLGGPPAVR 276
Gallus_gallus   LKEDFLG-----DSAKELCKAVSASMLAVETLEAPRE--PPREDCMFALPGPPRAPR 170
          *.:**          * .*****.*****:*:*          * **:* * * * *

Homo_sapiens      PTPCAPLAECKGSLDDSGKSTEDTAEYSPFKGGYTKGLEGESLGCSSGSAAGSSGTTLE 340
Canis_lupus      --PCAPLAECKGSLDDGPGKTEETAEYSPFKAGYAKGLDGDLSGCSSSSEAGSSGTTLE 341
Bos_taurus      PTPCAPLAECKGSLDDGPGKTEETAEYSPFKAGYTKGLDTELSLCSGSGEAGSSGTTLE 322
Mus_musculus    PTPCAPLPECKGLPLDEGPGKSTEDTAEYSSFKGGYAKGLEGESLGCSSGSEAGSSGTTLE 333
Rattus_norvegicus PTPCAPLAECKGLSLDDEGPGKTEETAEYSSFKGGYAKGLEGESLGCSSGSEAGSSGTTLE 336
Gallus_gallus   PDAAEPP-----EPTPAAFK-----SGAEALAVE 197
          . . *          :. . . :.*.          . * .: :**

Homo_sapiens      LPSTLSLYKSGALDEAAAYQSRDYNFPLALAGPPPPPPPHPHARIKLENPLDYGSAWA 400
Canis_lupus      MPSTLSLYKSGALDEAAAYQSRDYNFPLSLGGPPPPPPPHPHARIKLENPLDYGSAWA 401
Bos_taurus      LPSTLSLYKSGALDEVAAYQTRDYNFPLALAGPPPPPPPHPHARIKLENPLDYGSAWV 382
Mus_musculus    IPSSLSLYKSGALDEAAAYQNRDYNFPLALSGPPPPPPPHPHARIKLENPLDYGSAWA 393
Rattus_norvegicus IPSSLSLYKSGAVDEAAAYQNRDYNFPLALSGPPPPPPPHPHARIKLENPLDYGSAWA 396
Gallus_gallus   VPAGLPLYRVSPPPEPP--GRDCFVLP-----PPARIKLESPEP----- 236
          :*: *.*: . . * . . ** : :*          * :*****. * :

Homo_sapiens      AAAAQCRYGDLASLHGAGAAGPGSGSPSAAASSSWHTLFTAEEGQLYGPCCGGGGGGGGG 460
Canis_lupus      AAAAQCRYGDLASLHGAGAAGPSSGSPSATTSSSWHTLFTAEEGQLYGP--CGGGGGGSA 459
Bos_taurus      AAAAQCRYGDLASLHGGGAAGPGSGSPSAAASSSWHTLFTAEEGQLYGPVAVCGGGGGGSA 442
Mus_musculus    AAAAQCRYGDLGSLHGGSVAGPSTGSPATTSSSWHTLFTAEEGQLYGP--GGGGGSSSP 451
Rattus_norvegicus AAAAQCRYGDLASLHGGSVAGPSTGSPATASSSWHTLFTAEEGQLYGP--GGGGGSSSP 454
Gallus_gallus   -----AAVGAWGSP--VPAPPWPSFF--ADEGQLYGP-----CAEPPP 270
          . * . ** . . . . * : :* * .*****

Homo_sapiens      GGGGGGGGGGGGEEAGAVAPYGYTRPPQGLAQEQESDFTAPDVWYPGGMVSRVPYPS-TC 519
Canis_lupus      G-----DGGSVAPYGYTRPPQGLAQEQEGDFPPDVWYPGGVVSrvVPYPS-SC 506
Bos_taurus      G-----EAGAVAPYGYTRPPQGLAQEQEGDFSPDVWYPGGVVSrvVPYPS-SC 489
Mus_musculus    S-----DAGVPAYGYTRPPQGLAQEQESDYSASEVWYPGGVVSrvVPYPS-NC 498
Rattus_norvegicus S-----DAGVPAYGYTRPPQGLAQEQEGDFSAVWYPGGVVSrvVPYPS-SC 501
Gallus_gallus   G-----AFGCRP-----ENADFAA--DAWHP-----MARAPYAAPTSC 302
          .          .:* **          :*: . . . :*:*          : * .: :* . *

```

Homo_sapiens VKSEMGPMWDSYSGPYGDMRLETARDHVLPIDYFFPPQKTCLICGDEASGCHYGALTCGS 579
 Canis_lupus VKSEMGSMWESYSGPYGDMRLETARDHVLPIDYFFPPQKTCLICGDEASGCHYGALTCGS 566
 Bos_taurus VKSEMGPMWENYSGPYGDMRLETTRDHVLPIDYFFPPQKTCLICGDEASGCHYGALTCGS 549
 Mus_musculus VKSEMGPMWENYSGPYGDMRLDSTRDHVLPIDYFFPPQKTCLICGDEASGCHYGALTCGS 558
 Rattus_norvegicus VKSEMGPMWENYSGPYGDMRLDSTRDHVLPIDYFFPPQKTCLICGDEASGCHYGALTCGS 561
 Gallus_gallus IKSELGPWAEGYAGAYGDRLEAGREHILPIDYFFPPQKTCLICGDEASGCHYGALTCGS 362
 :*:*. * :. *:*. *::*: : *:*.*****

Homo_sapiens CKVFFKRAAEGKQKYL CASRN DCTIDKFRKNC PSCRLRKY EAGMTLGARKLKKLGNL K 639
 Canis_lupus CKVFFKRAAEGKQKYL CASRN DCTIDKFRKNC PSCRLRKY EAGMTLGARKLKKLGNL K 626
 Bos_taurus CKVFFKRAAEGKQKYL CASRN DCTIDKFRKNC PSCRLRKY EAGMTLGARKLKKLGNL K 609
 Mus_musculus CKVFFKRAAEGKQKYL CASRN DCTIDKFRKNC PSCRLRKY EAGMTLGARKLKKLGNL K 618
 Rattus_norvegicus CKVFFKRAAEGKQKYL CASRN DCTIDKFRKNC PSCRLRKY EAGMTLGARKLKKLGNL K 621
 Gallus_gallus CKVFFKRAAEGKQKYL CASRN DCTIDKFRKNC PSCRLRKY EAGMTLGARKLKKLGS L K 422

Homo_sapiens LQEEGEASSTTSPTTEETQKLT VSHIEGYEQPIFLNVLEAIEPGVVCAGHDNNQPSF A 699
 Canis_lupus LQEEGEASNVTSPTEETQKLT VSHIEGYEQPIFLNVLEAIEPGVVCAGHDNNQPSF A 686
 Bos_taurus LQEEGEASSATSPTEETPAQKLT VSHIEGYEQPIFLNVLEAIEPGVVCAGHDNNQPSF A 669
 Mus_musculus LQEEGENSNAGSPTEDPSQKMT VSHIEGYEQPIFLNVLEAIEPGVVCAGHDNNQPSF A 678
 Rattus_norvegicus LQEEGENSSAGSPTEDPSQKMT VSHIEGYEQPIFLNVLEAIEPGVVCAGHDNNQPSF A 681
 Gallus_gallus TQDEAEAASSSSPTTEEQAPKVM THVNGFECQPIFLNVLEAIEPAVVCAGHDNSQPSF S 482
 :.* :. *::*: : *::*: :*:*****

Homo_sapiens ALLSSLNELGERQLVHVVKWAKALPGFRNLHVDDQMAVIQYSWMGLMVFAMGWR SFTNV N 759
 Canis_lupus ALLSSLNELGERQLVHVVKWAKALPGFRNLHVDDQMAVIQYSWMGLMVFAMGWR SFTNV N 746
 Bos_taurus ALLSSLNELGERQLVHVVKWAKALPGFRNLHVDDQMAVIQYSWMGLMVFAMGWR SFTNV N 729
 Mus_musculus ALLSSLNELGERQLVHVVKWAKALPGFRNLHVDDQMAVIQYSWMGLMVFAMGWR SFTNV N 738
 Rattus_norvegicus ALLSSLNELGERQLVHVVKWAKALPGFRNLHVDDQMAVIQYSWMGLMVFAMGWR SFTNV N 741
 Gallus_gallus NLLSSLNELGERQLVYVVKWAKALPGFRNLHVDDQMS I I QYSWMGLMIFAMGWR SFTNV N 542

Homo_sapiens SRMLYFAPDLVFN EYRMHKS RMY SQCVRMRHLSQEFGLQITPQEFLCMKALLFSIIPV 819
 Canis_lupus SRMLYFAPDLVFN EYRMHKS RMY SQCVRMRHLSQEFGLQITPQEFLCMKALLFSIIPV 806
 Bos_taurus SRMLYFAPDLVFN EYRMHKS RMY SQCVRMRHLSQEFGLQITPQEFLCMKALLFSIIPV 789
 Mus_musculus SRMLYFAPDLVFN EYRMHKS RMY SQCVRMRHLSQEFGLQITPQEFLCMKALLFSIIPV 798
 Rattus_norvegicus SRMLYFAPDLVFN EYRMHKS RMY SQCVRMRHLSQEFGLQITPQEFLCMKALLFSIIPV 801
 Gallus_gallus SRMLYFAPDLVFN EYRMHKS RMY SQCVRMRQLSQEFGLQITPQEFLCMKALLFSIIPV 602

Homo_sapiens DGLKNQKFFDEL RMNYIKELDR I IACRKNPTSCSRRFYQLTKLLDSVQPIARELHQFTF 879
 Canis_lupus DGLKNQKFFDEL RMNYIKELDR I IACRKNPTSCSRRFYQLTKLLDSVQPIARELHQFTF 866
 Bos_taurus DGLKNQKFFDEL RMNYIKELDR I IACRKNPTSCSRRFYQLTKLLDSVQPIARELHQFTF 849
 Mus_musculus DGLKNQKFFDEL RMNYIKELDR I IACRKNPTSCSRRFYQLTKLLDSVQPIARELHQFTF 858
 Rattus_norvegicus DGLKNQKFFDEL RMNYIKELDR I IACRKNPTSCSRRFYQLTKLLDSVQPIARELHQFTF 861
 Gallus_gallus DGLKNQKLFDEL RMNYIKELDR I IACRKNPTSCSRRFYQLTKVLDSVHPIAKDLHQFTF 662

Homo_sapiens DLLIKSHMVSVD FPEMMAE I I SVQVPKILSGVKVPIYFHTQ 920
 Canis_lupus DLLIKSHMVSVD FPEMMAE I I SVQVPKILSGVKVPIYFHTQ 907
 Bos_taurus DLLIKSHMVSVD FPEMMAE I I SVQVPKILSGVKVPIYFHTQ 890
 Mus_musculus DLLIKSHMVSVD FPEMMAE I I SVQVPKILSGVKVPIYFHTQ 899
 Rattus_norvegicus DLLIKSHMVSVD FPEMMAE I I SVQVPKILSGVKVPIYFHTQ 902
 Gallus_gallus DLLIKAHMVSVD YPEMMAE I I SVQVPKILSGVKVPIYFHA E 703

Annexe 12. Alignement protéique interespèces des trois isoformes de la protéine MAML1.

```

Homo_sapiens_iso1  MDDWKSRLVIKSMPLPHFAMVGNRQEPKRLQESG-----TV 35
Homo_sapiens_iso2  MDDWKSRLVIKSMPLPHFAMVGNRQEPKRLQESGKKPSWMEEEEDLSFLYKSSPGRKKHQTGTV 60
Homo_sapiens_iso3  MDDWKSRLVIKSMPLPHFAMVGNRQEPKRLQESG-----TV 35
Pan_troglodytes    MDDWKSRLVIKSMPLPHFAMVGNRQEPKRLQESGKKPSWMEEEEDLSFLYKSSPGRKKHQTGTV 60
Canis_familiaris   -----
Bos_taurus         MDDWKSRLVVKSMPLPHFAMVGNRQEPKRLQESAQG-----TT 37
Mus_musculus       MDDWKSRLVIENMLPHFMVGNRQETRKLQESG-----TS 35

Homo_sapiens_iso1  KRRQEEDHFQFPDMADGGYPNKIKRRCLEDVTLAMGPGAHPSTACAE LQVPPLTINPSPA 95
Homo_sapiens_iso2  KRRQEEDHFQFPDMADGGYPNKIKRRCLEDVTLAMGPGAHPSTACAE LQVPPLTINPSPA 120
Homo_sapiens_iso3  KRRQEEDHFQFPDMADGGYPNKIKRRCLEDVTLAMGPGAHPSTACAE LQVPPLTINPSPA 95
Pan_troglodytes    KRRQEEDHFQFPDMADGGYPNKIKRRCLEDVTLAMGPGAHPSTACAE LQVPPLTINPSPA 120
Canis_familiaris   -----MADGGYPNKIKRRCLEDVTLAMGPGAHPSTACAE LQVPPLTMNPSPA 47
Bos_taurus         KRRQEGEDFQLSGMDEGYPNQIKRRCLEDVTLAMGPGAHPSTACAQLQVPALPMNPSSST 97
Mus_musculus       KRRQEGENFHFTGMADGSYPNKIKRRCLEDVTLAMGPGAHPSTLSTEMQMPTLNMPNTSA 95
                  * . * . * * : * * * * * * * * * * * * * * * : . : : * : * * * : * * : :

Homo_sapiens_iso1  AMGVAGQSLLLENPMNG----NIMGSPFVVPQTTEVGLKGPTVPYYEKINSVPAVDQE 150
Homo_sapiens_iso2  AMGVAGQSLLLENPMNG----NIMGSPFVVPQTTEVGLKGPTVPYYEKINSVPAVDQE 175
Homo_sapiens_iso3  AMGVAGQSLLLENPMNG----NIMGSPFVVPQTTEVGLKGPTVPYYEKINSVPAVDQE 150
Pan_troglodytes    AMGVAGQSLLLENPMNG----NIMGSPFVVPQTTEVGLKGPTVPYYEKINSVPAVDQE 175
Canis_familiaris   AVGVASHSLPLETNPLNG----SVMGSPFVLPAAELGVKGPAGPYDKAGSVPAVDQE 102
Bos_taurus         AMAAPGHPLLLDNSPNR----SVMGPPFAGPPTAEMGVKGPSIPYDKTNSAPAVDQE 152
Mus_musculus       DLGVAGQSLLLENPLDNSVNVSSAMGSPFVGPSTADTGLKGHAVPYYEKNNMSPAVDQE 155
                  : . . . : . * * : . . * : . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Homo_sapiens_iso1  LQELLEELTKIQDPSNELDLEKILGTKPEEPLVLDH-PQATLSTTPKPSVQMSHLESIA 209
Homo_sapiens_iso2  LQELLEELTKIQDPSNELDLEKILGTKPEEPLVLDH-PQATLSTTPKPSVQMSHLESIA 234
Homo_sapiens_iso3  LQELLEELTKIQDPSNELDLEKILGTKPEEPLVLDH-PQATLSTTPKPSVQMSHLESIA 209
Pan_troglodytes    LQELLEELTKIQDPSNELDLEKILGTKPEEPLVLDH-PQATLSTTPKPSVQMSHLESIA 234
Canis_familiaris   LQDLLEELTKIQEPSNLDLEKILGSKPEEPLVLEH-PQATLGAPAKPSAALPHLESIA 161
Bos_taurus         LQDLLEELTEIQESSQSELDLEKILGTKPEEPLVLQHHPPATLGATAKPTVQMPLRESLS 212
Mus_musculus       LQDLLEELTKIQEPSNDLDLEKILGSKPEEPLVLHN-PQAPLGPAPKLPVQMHPMESLG 214
                  * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Homo_sapiens_iso1  SSKEFASSCSQVTG--MSLQIPSSSTGISYSIPSTSKQIVSPSSSMAQS----- 256
Homo_sapiens_iso2  SSKEFASSCSQVTG--MSLQIPSSSTGISYSIPSTSKQIVSPSSSMAQS----- 281
Homo_sapiens_iso3  SSKEFASSCSQVTG--MSLQIPSSSTGISYSIPSTSKQIVSPSSSMAQS----- 256
Pan_troglodytes    SSKEFASSCSQVTG--MSLQIPSSSTGISYSIPSTSKQIVSPSSSMAQS----- 281
Canis_familiaris   TSKEFTSSCSQLPGAATSLHVPPSPGGLNYVIPSASKQIVASPGSSAAAAAAAAAAAAASQ 221
Bos_taurus         SSKDFASSCSLDTG--VSLQIPSSSAGFSYAITPASKQMASPSSSSTGQA----- 259
Mus_musculus       SSKEFASSCSQVAG--TSLPIMPSSSTGMSYSIPSSSKQIVSSSSSTAQAQV----- 263
                  : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Homo_sapiens_iso1  -KSQVQAMLVVALPPLVPVQWHAHQKALAAASKQGSATKQQGPTPSWSGLPPPGLSPFY 315
Homo_sapiens_iso2  -KSQVQAMLVVALPPLVPVQWHAHQKALAAASKQGSATKQQGPTPSWSGLPPPGLSPFY 340
Homo_sapiens_iso3  -KSQVQAMLVVALPPLVPVQWHAHQKALAAASKQGSATKQQGPTPSWSGLPPPGLSPFY 315
Pan_troglodytes    -KSQVQAMLVVALPPLVPVQWHAHQKALAAASKQGSATKQQGPTPSWSGLPPPGLSPFY 340
Canis_familiaris   AKSQVQMLPVTPVPALQVPVQWHAHQKALAAASKQGATARQGTTPSWSSLPPPGLSPSY 281
Bos_taurus         -KNQAQVTLAALPPLVPSQWHAHQKALAAASKQGSKKQLDPTTSWSGLPSGLSPFY 318
Mus_musculus       -KNQVQNMLPVTMPPLSVQWHAHQKALAAASKQGSATKQ-GSNRNWSSLPPPGLSPFY 321
                  * . * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Homo_sapiens_iso1  RVPVSPH-----PPPLPLPPPPPPFSPQSLMVSCMSSNTLSGSTLRGSPNALLSSMTSSS 370
Homo_sapiens_iso2  RVPVSPH-----PPPLPLPPPPPPFSPQSLMVSCMSSNTLSGSTLRGSPNALLSSMTSSS 395
Homo_sapiens_iso3  RVPVSPH-----PPPLPLPPPPPPFSPQSLMVSCMSSNTLSGSTLRGSPNALLSSMTSSS 370
Pan_troglodytes    RVPVSPH-----PPPLPLPPPPPPFSPQSLMVSCMSSNTLSGSTLRGSPNALLSSMTSSS 395
Canis_familiaris   RVPVSPHPPPPPPPPPPPPFSPQSLMVSCMASSNLPGSSFFQASPNALLASMASAS 341
Bos_taurus         QVPVVS-----PQPL-----PPFSPQSLMVSCMSSSLPGTTLQGSFNTLLSSLAPSS 367
Mus_musculus       LPVSPH-----PPPP--QPPPPFSPQNFTASCMSSSSLSGSAVQSSPNALLSSMAPSS 374
                  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Homo_sapiens_iso1  NAALGPAMPYAPEKLPSPALTOQPQFGPQSSILANLMSSTIKTPQGHLSALPASNPGFS 430
Homo_sapiens_iso2  NAALGPAMPYAPEKLPSPALTOQPQFGPQSSILANLMSSTIKTPQGHLSALPASNPGFS 455
Homo_sapiens_iso3  NAALGPAMPYAPEKLPSPALTOQPQFGPQSSILANLMSSTIKTPQGHLSALPASNPGFS 430
Pan_troglodytes    NAALGPAMPYAPEKLPSPALTOQPQFGPQSSILANLMSSTIKTPQGHLSALPASNPGFS 455
Canis_familiaris   SAGLPPMLYTPDKLPSALSQQPPFSPQSSILANLVSSGVKSPPGHLLSALPTSNGPFS 401
Bos_taurus         STVLGPAPRYAPEKLPSPALTOQPQFPSTQTSILANLMSSTVHKHPQGHLSALPTSNTPGL 427
Mus_musculus       NASLGP TL P Y V P A K L P L P L N Q Q P Q F S P Q S S I L A N L V S S V K S P Q G H L I S A L P T S T P G F S 434
                  . : * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Homo_sapiens_iso1  PPYRPEKLSSPGLPQQSFPTQCCLIRSLTP-TSNLLSQQQQQQQQQQ----- 477
Homo_sapiens_iso2  PPYRPEKLSSPGLPQQSFPTQCCLIRSLTP-TSNLLSQQQQQQQQQQ----- 502
Homo_sapiens_iso3  PPYRPEKLSSPGLPQQSFPTQCCLIRSLTP-TSNLLSQQQQQQQQQQ----- 477
Pan_troglodytes    PPYRPEKLSSPGLPQQSFPTQCCLIRSLTP-TSNLLSQQQQQQQQQQ----- 502
Canis_familiaris   PPYRPEKLSSPGLPQQSFPTQCCLIRSLTPSSSNPLAQPPPPPPPPPPPPQQP----- 454
Bos_taurus         TPYRPELSSPSLPQQSFPTAQCLIQGLTT-SAHPLCQPQP----- 468
Mus_musculus       PPYRPEKLSSPGLPQQSFPTQCCLIRSLTP-TSNLLSQQQQQQQQQQQQQQQQQQ 493
                    .*****.*****.*****.*.***.*.***.:::*.

Homo_sapiens_iso1  ---ANVIFKPISSNS-SKTLSMIMQQGMASSSPGATEPFTFGNTKPLSHFVSEFPGQKMP 533
Homo_sapiens_iso2  ---ANVIFKPISSNS-SKTLSMIMQQGMASSSPGATEPFTFGNTKPLSHFVSEFPGQKMP 558
Homo_sapiens_iso3  ---ANVIFKPISSNS-SKTLSMIMQQGMASSSPGATEPFTFGNTKPLSHFVSEFPGQKMP 533
Pan_troglodytes    ---ANAIFKPMSSNS-SKTLSMIMQQGMASSSPGATEPFTFGNTKPLSHFVSEFPGQKMS 558
Canis_familiaris   ---ANAIFKSMSTNS-PKTLSTMIMQQGLASPGGAPFPFTFGNTKPLSHFVSEFPGQKMP 510
Bos_taurus         ---ASAIYKP-----KTLSMIMQQGLSSPSFGASEFPFFGHTKPLSHFMSEFPGQKMP 518
Mus_musculus       QHQANSIFKPMTSSQPKTLSTMIMQQGLSSSSPEAPEPFTFSNTKPLSHFVSEFSPQKMA 553
                    * . *.*. *****.:*.* * .***.*.:*****.***.***.

Homo_sapiens_iso1  SMPTTSRQPSLLHYLQQPTPTQASSATASSTATATLQLQQQ-----QQQQQ 579
Homo_sapiens_iso2  SMPTTSRQPSLLHYLQQPTPTQASSATASSTATATLQLQQQ-----QQQQQ 604
Homo_sapiens_iso3  SMPTTSRQPSLLHYLQQPTPTQASSATASSTATATLQLQQQ-----QQQQQ 579
Pan_troglodytes    SMPTTSRQPSLLHYLQQPTPTQASSATASSTATATLQLQQQ-----QQQQQ 604
Canis_familiaris   SVPSASRQPSLLHYLQQPPP--TSSATASSTTATLQLQQQQQQQQQQQQQQHQQHQQH 568
Bos_taurus         SVPTTSRQALLHYLQQPTPPASSATASS--TATLQLQQQ----- 557
Mus_musculus       SMSTHSRQSSLLHYLPQATPAHAPSATASSTATATLQLQQQQH-----QQQQQ 601
                    *.:.***.:*****.*.*.:.*****.*****

Homo_sapiens_iso1  QQPDHSSFLLQQMMQPQRFQRSVAS-DSMPALPRQQEEQRSGLMAMTPERQNAIYSQQM 638
Homo_sapiens_iso2  QQPDHSSFLLQQMMQPQRFQRSVAS-DSMPALPRQG--CCHLFAWTS-----AA 651
Homo_sapiens_iso3  QQPDHSSFLLQQMMQPQRFQRSVAS-DSMPALPRQG--CCHLFAWTS-----AA 626
Pan_troglodytes    QQPDHSSFLLQQMMQPQRFQRSVAS-DSMPALPRQG--CCHLFAWTS-----AA 651
Canis_familiaris   QQPDHSSFLLQQMMQPQRFQRSVAP-DSMPSLPRQVRRLASAHSSAPG----NWCSSA 622
Bos_taurus         --PDISSFLLQHVTQQPQRFQRSALALGDSMPSLPRQA--CCQLFSWTS-----VAG 604
Mus_musculus       QQPDQSSFLLQQIMQPQRFQRMMAS-DSMPALPGQG--CCHRCAWTS-----TA 648
                    ** *****.: *****.* *****.* * . : .

Homo_sapiens_iso1  SPFEAVQEQVTSKCSRIKASPPSSKHLMPPRTGLLQNNLSPGMIPLTRHQSCGEMGVISP 698
Homo_sapiens_iso2  SSVKPKQHGHNSFTSRQDPQP-----GDVSPSNITHV-DKACK----- 688
Homo_sapiens_iso3  SSVKPKQHGHNSFTSRQDPQP-----GDVSPSNITHV-DKACK----- 663
Pan_troglodytes    SSVKPKQHGHNSFTSRQDPQP-----GDVSPSNITHV-DKACK----- 688
Canis_familiaris   ALVEHQPCWNSHPSRQGRPP-----GDMSPSHATHV-DKACK----- 659
Bos_taurus         SMEHQLNHHWDYPPIRQHPQP-----GAVSPSKIITHV-DKACK----- 641
Mus_musculus       LWLEHQHQWNSLTSTHGHVP-----PSNLTHV-DKACK----- 681
                    . . . * * . . . . : : *

Homo_sapiens_iso1  TLGKRQGI FTSSPQCPILSHSGQTPLGRLDVSCQHMQSPKATPPEVPLPFGFCPSSLGTQS 758
Homo_sapiens_iso2  -LGEAR-----HP-QVSLGRQPPSCQALGS-----ESFLPG-----S 718
Homo_sapiens_iso3  -LGEAR-----HP-QVSLGRQPPSCQALGS-----ESFLPG-----S 693
Pan_troglodytes    -LGEAR-----HP-QVSLGRQPPSCQALGS-----ESFLPG-----S 718
Canis_familiaris   -LGEAR-----HPQVSLGRQPPSCQALGS-----ESFLPS-----S 689
Bos_taurus         -LGEAR-----PPQVSLGRQPPSCQALGS-----ESFLPS-----S 671
Mus_musculus       -LGEAR-----PPHVSLGRQPPSRQALGS-----ESFLPG-----S 711
                    **: : : .***. * : * * ** *

Homo_sapiens_iso1  LSPHQLR RRPVPRMPTAFNNAAWVTAAAAVTTAVSGKTPLSQVDNSVQQHSPSGOACLQR 818
Homo_sapiens_iso2  SFAHELAR-----VTSSYSTSEAAP----- 738
Homo_sapiens_iso3  SFAHELAR-----VTSSYSTSEAAP----- 713
Pan_troglodytes    SFAHELAR-----VTSSYSTSEAAP----- 738
Canis_familiaris   SFAHELAR-----VTSSHSTSEAAP----- 709
Bos_taurus         SFAHELAQ-----VTSSYSTSEAAP----- 691
Mus_musculus       SFAHELAR-----VTSTSSYNTSEAAP----- 733
                    .*: * : * : : * .

Homo_sapiens_iso1  PSDWEAQVPAAMGTQVPLANNPFSLLGSQSLR-QSPVQGPVPVANTTKFLQQGMASFSP 877
Homo_sapiens_iso2  ---WGSWDPKAWR-QVPAPLLPSCDATARGTEI-RSYGNDP----- 774
Homo_sapiens_iso3  ---WGSWDPKAWR-QVPAPLLPSCDATARGTEI-RSYGNDP----- 749
Pan_troglodytes    ---WGSWDPKAWR-QVPAPLLPSCDATARGTEI-RSYGNDP----- 774
Canis_familiaris   ---WGGWDPKAWR-QVPAPLLPSCDAPDCEPKGGRGCASAP----- 746
Bos_taurus         ---WGGWDPKAWR-QVPAPLLPSCDTVAREAEI-RSYGNDP----- 727
Mus_musculus       ---WGGWDPKAWR-QVPAPLLPSCDAAAREAEI-RSYGNDP----- 769
                    * . * * * * * . * . . : . *

```


Homo_sapiens_iso1 LSPIQGI~~EP~~PSYVAAAATAAAASAVAASQFPGPFDR~~TD~~IPPELPPADFLRQP~~Q~~PPLNDLI 937
 Homo_sapiens_iso2 -----
 Homo_sapiens_iso3 -----
 Pan_troglodytes -----
 Canis_familiaris -----PDPSPSSCLLCT~~TR~~VLGNHLSG-----QLHCGLCT 777
 Bos_taurus -----
 Mus_musculus -----

Homo_sapiens_iso1 SSPDCNEVDFIEALLK~~G~~SCVSPDEDWVCNLRLLIDDILEQHAAAQNATAQNSGQV~~TQ~~DAGA 997
 Homo_sapiens_iso2 -----
 Homo_sapiens_iso3 -----
 Pan_troglodytes -----
 Canis_familiaris P~~S~~VFSDPTQEVFALEVG~~S~~WITPLEDWQREER~~GQ~~KEAPSSLSMIAMTLAHPV----- 829
 Bos_taurus -----
 Mus_musculus -----

Homo_sapiens_iso1 L 998
 Homo_sapiens_iso2 -
 Homo_sapiens_iso3 -
 Pan_troglodytes -
 Canis_familiaris -
 Bos_taurus -
 Mus_musculus -

Annexe 13. Alignement protéique interespèces de la protéine NR5A1.

```

Homo_sapiens      -----
Pan_troglodytes  MSLQQRSIEQSKLLICGVGERFCKLPLYKSSFNTNVCSEFRHRTKSPFIAEESPAESLSQVAV 60
Canis_familiaris -----
Bos_taurus       -----
Mus_musculus     -----
Rattus_norvegicus -----
Gallus_gallus    -----

Homo_sapiens      -----
Pan_troglodytes  CSEPEPDLWTVFNVFCTSPFMTWAFKQGVNVLHCKLRLLESFARFSGLVLNLEKFPRI 120
Canis_familiaris -----
Bos_taurus       -----
Mus_musculus     -----
Rattus_norvegicus -----
Gallus_gallus    -----

Homo_sapiens      -----MD 2
Pan_troglodytes  CLKALNLAQRAPSPYAPLTVREVGKPPGIGGSKQDPPCPVSNQSKEWGILRVSVASLNV 180
Canis_familiaris -----MKLEKSADDDR 11
Bos_taurus       -----MD 2
Mus_musculus     -----MD 2
Rattus_norvegicus -----MD 2
Gallus_gallus    -----MD 2

Homo_sapiens      YSYDELDL-----ELCP----- 14
Pan_troglodytes  YSTSTCLSPATLFQGGPGTPLSPRPPSAFFLAPPRESSEGGSSGALPPGSSPSSCARRGF 240
Canis_familiaris AEQRTCLI----- 19
Bos_taurus       YSYDELDL-----ELCP----- 14
Mus_musculus     YSYDELDL-----ELCP----- 14
Rattus_norvegicus YSYDELDL-----ELCP----- 14
Gallus_gallus    YSYDELDL-----ELCP----- 14
.                *

Homo_sapiens      -----VCGDKVSGYHYGLLTCEC----- 33
Pan_troglodytes  GSPQASDISSATVATRPYPLPRCSATSHPRGIRHDPAGFTDRSCLLPLQAGDPRPPQPYT 300
Canis_familiaris -----CGDRATGLHYGIIISCEG----- 37
Bos_taurus       -----VCGDKVSGYHYGLLTCEC----- 33
Mus_musculus     -----VCGDKVSGYHYGLLTCEC----- 33
Rattus_norvegicus -----VCGDKVSGYHYGLLTCEC----- 33
Gallus_gallus    -----VCGDKVSGYHYGLLTCEC----- 33
.. .: * : *..

Homo_sapiens      -----KGFVKRTVQNNKHYTCT 50
Pan_troglodytes  CPDRGALGLRSSLAALGVAGLRLGGLLEDEGEDSSWTAERLPQGFVKRTVQNNKHYTCT 360
Canis_familiaris -----KGFVKRSICNKRPYTCT 54
Bos_taurus       -----KGFVKRTVQNNKHYTCT 50
Mus_musculus     -----KGFVKRTVQNNKHYTCT 50
Rattus_norvegicus -----KGFVKRTVQNNKHYTCT 50
Gallus_gallus    -----KGFVKRTVQNNKHYTCT 50
:*****: * : *

Homo_sapiens      ESQSCKIDKTQRKRCPPCRFQKCLTVGMRLEAVRADRMGGRNKFGPMYKRDRALKQQKK 110
Pan_troglodytes  ESQSCKIDKTQRKRCPPCRFQKCLTVGMRLEAVRADRMGGRNKFGPMYKRDRALKQQKK 420
Canis_familiaris ESQSCKIDKTQRKRCPPCRFQKCLTVGMRLEAVRADRMGGRNKFGPMYKRDRALKQQKK 114
Bos_taurus       ESQSCKIDKTQRKRCPPCRFQKCLTVGMRLEAVRADRMGGRNKFGPMYKRDRALKQQKK 110
Mus_musculus     ESQSCKIDKTQRKRCPPCRFQKCLTVGMRLEAVRADRMGGRNKFGPMYKRDRALKQQKK 110
Rattus_norvegicus ESQSCKIDKTQRKRCPPCRFQKCLTVGMRLEAVRADRMGGRNKFGPMYKRDRALKQQKK 110
Gallus_gallus    ESQNCIDKTQRKCCPYCRFQKCLTVGMRLEAVRADRMGGRNKFGPMYKRDRALKQQKK 110
***.***** **.*

Homo_sapiens      AQIRANGFKLETGPPMGVPPP---PPAPDYVLPSSLHGPEPKGLAAGPPAGPLGDFGAP 167
Pan_troglodytes  AQIRANGFKLETGPPMGVPPP---PPAPDYVLPSSLHAPEPKGLAAGPPAGPLGDFGAP 477
Canis_familiaris AQIRANGFKLETGPPMGVPPP---PPPPDYMLPPLHHAPEPKGLASGPPAGPLGDFGAP 171
Bos_taurus       AQIRANGFKLETGPPVGVPPP---PPPPDYMLPHGLHASEPKGLASGPPAGPLGDFGAP 167
Mus_musculus     AQIRANGFKLETGPPMGVPPP---PPPPDYMLPPLHHAPEPKALVSGPPSPLGDFGAP 167
Rattus_norvegicus AQIRANGFKLETGPPMGVPPP---PPPPDYMLPPLHHAPEPKALVSGPPSPLGDFGAP 167
Gallus_gallus    ALIRANGFKLETVPQIVSPVQNDYGLSSTIHSIHAMAKTLPPNPAALTPADYERGPYGT 170
* ***** * : * .. : : : * : . * . * : * :

```

Homo_sapiens	ALPMAVPGAHGPLAGYLYPAFFGRAIKSEYPEFYASPPQ-PGLPYGYPEPFGSGG--PNVP	224
Pan_troglodytes	ALPMAVPGAHGPLAGYLYPAFFGRAIKSEYPEFYASPPQ-PGLPYGYPEPFGSGG--PNVP	534
Canis_familiaris	ALPMAVPSAHGPLAGYLYPSFPGRAIKSEYPEFYASPPQ-PGPPYGYPEPFGSGG--PGVP	228
Bos_taurus	ALPMAVPSAHGPLAGYLYPAFFGRAIKSEYPEFYASPPQ-PGPPYGYPEPFGSGG--PGVP	224
Mus_musculus	SLPMAVPGPHGPLAGYLYPAFNSRTIKSEYPEFYASPPQQPQPPYSYPEPFGSGG--PNVP	225
Rattus_norvegicus	SLPMAVPGPHGPLAGYLYPAFNSRTIKSEYPEFYASPPQQPQPPYSYPEPFGSGG--PNVP	225
Gallus_gallus	SLAMTVPG-HTPLAGYHYPSFPNRAIKSEYPDHYSAHE-AVPTYAYPETYPSSSPDIP	228
	:*.*:* * ***** **:*..*:*	
Homo_sapiens	ELILQLLQLEPDEDQVRARILGCLQ-EPTKSRPDQPAAFGLLCRMADQTFISIVDWARRC	283
Pan_troglodytes	ELILQLLQLEPDEDQVRARILGCLQ-EPTKSRPDQPAAFGLLCRMADQTFISIVDWARRC	593
Canis_familiaris	ELILQLLQLEPDEDQVRARIVGCLQ-EPAKGRPDQPAPFSLLCRMADQTFISIVDWARRC	287
Bos_taurus	ELILQLLQLEPDEDQVRARIVGCLQ-EPAKGRPDQPAPFSLLCRMADQTFISIVDWARRC	283
Mus_musculus	ELILQLLQLEPEEDQVRARIVGCLQ-EPAKSRSDQPAPFSLLCRMADQTFISIVDWARRC	284
Rattus_norvegicus	ELILQLLQLEPEEDQVRARIVGCLQ-EPAKSRPDQPAPFSLLCRMADQTFISIVDWARRC	284
Gallus_gallus	EVILKLLQLEPDEAQQKARILACLQQEQGKGRHEKLSSTFGLMCKMADQTLFSIVEWARSC	288
	:	
Homo_sapiens	MVFKELEVADQMTLLQNCWSELVLDHIYRQVQHKGEGSILLVTGQEVELTTVAQAQAGSL	343
Pan_troglodytes	MVFKELEVADQMTLLQNCWSELVLDHIYRQVQHKGEGSILLVTGQEVELTTVAQAQAGSL	653
Canis_familiaris	MVFKELEVADQMTLLQNCWSELVLDHIYRQIQHKGKDSILLVTGQEVEMSTVAQAQAGSL	347
Bos_taurus	MVFKELEVADQMTLLQNCWSELVLDHIYRQIQHKGKDSILLVTGQEVELTTVAQAQAGSL	343
Mus_musculus	MVFKELEVADQMTLLQNCWSELVLDHIYRQVQYKEDSILLVTGQEVELSTVAVQAQAGSL	344
Rattus_norvegicus	MVFKELEVADQMTLLQNCWSELVLDHIYRQVQYKEDSILLVTGQEVELSTVAVQAQAGSL	344
Gallus_gallus	IFFKELEVGDQMKLLQNCWSELVLDHVYRQLQHKGKHSVLLVTGQEVLDLSAVAQAQAGSI	348
	:.******.*.*.******:*	
Homo_sapiens	LHSLVLRQELVQLLALQLDRQEFVCLKFIILFSLDLKFLNNHILVKDAQEKANAALLD	403
Pan_troglodytes	LHSLVLRQELVQLLALQLDRQEFVCLKFIILFSLDLKFLNNHILVKDAQEKANAALLD	713
Canis_familiaris	LHSLVLRQELVQLHALQLDRQEFVCLKFLILFSLDVKFLNNHSLVKDAQEKANAALLD	407
Bos_taurus	LHSLVLRQELVQLHALQLDRQEFVCLKFLILFSLDVKFLNNHSLVKDAQEKANAALLD	403
Mus_musculus	LHSLVLRQELVQLHALQLDRQEFVCLKFLILFSLDVKFLNNHSLVKDAQEKANAALLD	404
Rattus_norvegicus	LHSLVLRQELVQLHALQLDRQEFVCLKFLILFSLDVKFLNNHSLVKDAQEKANAALLD	404
Gallus_gallus	LHSLVLRQELVHLHSPQVDRQEFVCLKFLILFSLDVKYLENHALAKDAQEKANAALLE	408
	:	
Homo_sapiens	YTLCHYPHCGDKFQQLLLCLVEVRALSMQAKYLYHKHLGNEMPRNNLLIEMLQAKQT	461
Pan_troglodytes	YTLCHYPHCGDKFQQLLLCLVEVRALSMQAKYLYHKHLGNEMPRNNLLIEMLQAKQT	771
Canis_familiaris	YTLCHYPHCGDKFQQLLLCLVEVRALSMQAKYLYHKHLGNEMPRNNLLIEMLQAKQT	465
Bos_taurus	YTLCHYPHCGDKFQQLLLCLVEVRALSMQAKYLYHKHLGNEMPRNNLLIEMLQAKQT	461
Mus_musculus	YTLCHYPHCGDKFQQLLLCLVEVRALSMQAKYLYHKHLGNEMPRNNLLIEMLQAKQT	462
Rattus_norvegicus	YTLCHYPHCGDKFQQLLLCLVEVRALSMQAKYLYHKHLGNEMPRNNLLIEMLQAKQT	462
Gallus_gallus	YTVCHYPHCTDKFRQLLRLLTEVRALSMQAEYLYHKHLSGEVPCNNLLIEMLHAKRT	466
	::*:*:* *:*:*:* *.******:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*.******:*:*:	

Table des illustrations

Figure 1. Développement des organes génitaux externes (Moore and Persaud, 2003).	29
Figure 2. Schéma montrant comment un chromosome Y peut perdre le gène <i>SRY</i> au profit d'un chromosome X.	37
Figure 3. Aperçu des facteurs impliqués dans le développement testiculaire (Eggers and Sinclair, 2012).	39
Figure 4. Représentation schématique de la protéine NR5A1.	42
Figure 5. Implication du gène <i>NR5A1/SF1</i> dans le déterminisme testiculaire.	43
Figure 6. Modèle de l'activité pro-testiculaire de DAX1 en fonction de la gamme de concentration (Ludbrook and Harley, 2004).	45
Figure 7. Structure du gène et de la protéine du récepteur aux androgènes (AR). ..	54
Figure 8. Sites d'action du gène <i>AR</i> dans la différenciation sexuelle.	54
Figure 9. Représentation schématique de la variation des triplets CAG selon la pathologie.	57
Figure 10. Facteurs <i>in utero</i> prédisposants au <i>testicular dysgenesis syndrome</i> (Kilcoyne and Mitchell, 2017)	65
Figure 11. Anatomie chirurgicale de l'hypospadias (Mouriquand and Mure, 2004). ..	67
Figure 12. Évolution de la classification de l'hypospadias (Hadidi and Azmy, 2011).	67
Figure 13. Rôle des gènes <i>AR</i> et <i>MAMLD1</i> dans la stéroïdogénèse (Kojima et al., 2010).	70
Figure 14. De gauche à droite, aspect pré et post-opératoire à moyen et long terme d'une fille née avec hyperplasie congénitale des surrénale.	77
Figure 15. Caractéristiques de la cohorte REMAPAR.	86
Figure 16. Représentation schématique des génotypes observés en cas de délétion ou duplication de deux SNP de type A/A et A/B.	90
Figure 17. Exemple de migration des amplicons de PCR de l'exon 1 sur des séries de 4 patients avec marqueur de taille.	106
Figure 18. Exemple de résultats obtenus pour le patient 11B0447 après séquençage par le logiciel Seqscape.	109
Figure 19. Représentation graphique de la variation du nombre de triplets de CAG et GGn de l'exon 1 du gène <i>AR</i>	110
Figure 20. Représentation schématique des isoformes du gène <i>MAMLD1</i> décrites dans la base de données NCBI.	119
Figure 21. Migration en gel d'agarose des produits de RT-PCR du gène <i>MAMLD1</i> obtenus à partir de deux ARN témoins (T1 et T2) issus de cultures de fibroblastes de prépuce.	120
Figure 22. Electrophorégramme correspondant au produit de RT-PCR de <i>MAMLD1</i> généré à partir d'ARN de fibroblastes préputiaux par le couple 3-6 et séquencé avec l'amorce 6R.	120
Figure 23. Dépôt en gel d'agarose 1% de l'ADN génomique issu du frottis urétral.	124
Figure 24. Dépôt en gel d'agarose 1% des produits de PCR des exons 1, 2, 3.1 et 3.2 du gène <i>MAMLD1</i> à partir d'ADN issu de cellules urothéliales (1 à 3) et de fibroblastes (4 à 5).	124

Figure 25. Représentation comparative des fréquences alléliques (MAF) des polymorphismes du gène <i>NR5A1</i> issus de populations contrôles (NCBI) et observées au sein de notre cohorte (N=20).	128
Figure 26. Représentation schématique du gène <i>NR5A1</i> , de la séquence d'acide aminée spécifique et de sa variation inter-espèce.	137
Figure 27. Translation 46,XY,t(7;11)(p14;q23).....	142
Figure 28. Flow chart de la cohorte de 223 patients atteints d'un hypospadias distal.	143
Figure 29. Exemples d'anomalies pangénomique.	147
Figure 30. Détection par puce à ADN de type SNP-array de régions communes d'homozygotie > 2 Mb chez quatre des cinq patients qui pourraient contenir des mutations homozygotes dans des gènes candidats.	149
Figure 31. Caractéristiques de la population REMAPAR.....	158
Figure 32. Corrélation entre le taux sérique maternel d'HCG total et beta libre chez des femmes enceintes ayant donné naissance à un enfant né vivant avec un hypospadias et un groupe contrôle.	160
Figure 33. Représentation des cas familiaux d'hypospadias.	174

Table des tableaux

Tableau 1. Tableau récapitulatif des gènes impliqués dans le déterminisme testiculaire (Baetens et al., 2019).....	35
Tableau 2. Tableau récapitulatif des gènes impliqués dans le déterminisme ovarien (Baetens et al., 2019).....	48
Tableau 3. Tableau récapitulatif des gènes impliqués dans la synthèse des hormones stéroïdiennes (Baetens et al., 2019)	53
Tableau 4. Facteurs cliniques, comportementaux, professionnels et environnementaux ayant été analysé comme potentiel facteur de risque de survenue d'un hypospadias (George et al., 2015).	62
Tableau 5. Polymorphismes associés avec la survenue d'un hypospadias en génétique humaine (Bouty et al., 2015).	72
Tableau 6. Ressources bio-informatiques utilisées pour l'élaboration et l'interprétation des données.....	96
Tableau 7. Données cliniques des patients hypospades inclus ayant bénéficié d'une étude génétique complète (N = 33).....	104
Tableau 8. Récapitulatif des résultats du séquençage comparatif de l'ADN germlinal et somatique du gène <i>AR</i>	107
Tableau 9. Comparaison des fréquences alléliques (MAF) des polymorphismes décrits du gène <i>AR</i> issus de populations contrôles (NCBI) et observées au sein de notre cohorte (N=33).	108
Tableau 10. Résultat du séquençage du gène <i>MAMLD1</i> à partir d'ADN de lymphocytes, de fibroblastes de prépuce et de cellules urothéliales chez vingt patients avec hypospadias.	122
Tableau 11. Résultat du séquençage du gène <i>NR5A1</i> à partir d'ADN de lymphocytes et de fibroblastes de prépuce.	129
Tableau 12. Bilans hormonaux.	134
Tableau 13. Caractéristiques de la cohorte des patients atteints d'un hypospadias distal.	139
Tableau 14. Tableau récapitulatif des CNVs répertoriées dans les 30 cas d'hypospadias avec anomalies en puce.	144
Tableau 15. Résumé des réarrangements chromosomiques détectés par puce à ADN de type SNP chez 30 patients.	145
Tableau 16. Gènes candidats (N=25) potentiellement impliqués dans la physiopathologie des hypospadias distaux isolés découverts par puces à ADN de type SNP.	148
Tableau 17. Distribution de l'hCGb libre sérique (en multiples de la médiane (MoM)).	161
Tableau 18. Différences sans et après ajustement du taux sérique des multiples de la médiane (MoM) de la bêta-hCG libre (hCGb) pour les différents phénotypes d'hypospadias en comparaison avec une population contrôle (régression quantique).	162
Tableau 19. Relation entre l'hypospadias et les paramètres de dysfonction placentaire (prématurité, petit poids de naissance, âge maternel).	162

Tableau 20. Résumé des études précédemment publiées rapportant l'association entre le taux maternel sérique de la bêta-hCG au premier trimestre et la survenue d'un hypospadias.....	165
Tableau 21. Variants candidats découverts par l'étude d'exome.....	176

Articles publiés dans la thématique

Les cinq documents mis en annexe sont des articles publiés par le candidat sur le sujet de la thèse : hypospadias et DSD. Ils ne sont pas introduits et cités dans le texte principal.

Il s'agit :

- De trois revues de la littérature sur l'hypospadias (Articles 1 à 3), et ;
- De deux articles scientifiques sur la thématique du laboratoire, analysant les gènes *SOX9* et *DHX37* lors de travaux de collaboration entre l'UMRS933 et le département de génétique humaine du Pr. McElvearey à l'Institut Pasteur (Articles 4 et 5).

A. Article 1 : Anomalies du pénis chez l'enfant. [Abnormalities of the genitalia in boys.]

B. Article 2 : Prise en charge néonatale des anomalies des organes génitaux : le point de vue du chirurgien

C. Article 3 : Génitoplastie masculinisante

D. Article 4 : Refining the regulatory region upstream of *SOX9* associated with 46,XX testicular Disorders of Sex Development (DSD)

E. Article 5 : Pathogenic variants in the DEAH-box RNA helicase *DHX37* are a frequent cause of 46,XY gonadal dysgenesis and 46,XY testicular regression syndrome

RESUME

Introduction. L'étiopathogénie de l'hypospadias reste largement discutée, faisant intervenir des facteurs endocriniens, génétiques, vasculaires et environnementaux.

Objectifs. Étudier les mécanismes génétiques impliquées dans la différenciation sexuelle masculine.

Matériels et méthodes. Une cohorte de 284 patients a été établie depuis 2011 pour séquençage de l'ADN lymphocytaire, préputial et urothélial de trois gènes candidats (*NR5A1*, *MAMLD1*, *AR*). Une analyse pangénomique (puce à ADN et Whole Exome Sequencing (WES)) a été réalisée. Le registre REMAPAR a été utilisé pour analyser l'association entre hormone chorionique gonadotrophique (hCGb) maternelle et hypospadias.

Résultats. Des polymorphismes dans *AR* ont une fréquence allélique significativement plus élevée ($p < 0,01$). Des variations non décrites des trois gènes ne semblent pas susceptibles d'altérer l'épissage. Une duplication hétérozygote intragénique de *NR5A1* a été retrouvée chez un individu. Par ailleurs, 35 anomalies (15,7%) pouvant être en lien avec l'hypospadias ont été identifiées par puces à ADN englobant 25 gènes candidats. L'analyse WES a mise en évidence 22 nouveaux variants. Enfin, une association a été constatée pour l'hCGb surtout en cas de forme sévère et après ajustement pour dysfonction placentaire ($p < 0,03$).

Conclusion. L'étude des trois gènes candidats n'a pas vérifié l'hypothèse selon laquelle les séquences lymphocytaires et sur les tissus cibles seraient différentes. Cependant, l'analyse pangénomique a trouvé 15,7% anomalies et 47 gènes potentiellement candidats. L'utilisation des nouveaux outils d'analyse génétique semble essentielle à la compréhension des mécanismes conduisant à l'hypospadias.

Mots-clés. Hypospadias ; Anomalies du Développement Génital ; Génétique ; Enfant ; Séquençage Génome Entier ; Hormone Chorionique Gonadotrophique ; Polymorphisme ; Récepteurs aux androgènes ; *Steroidogenic Factor 1*.

TITLE: Genetic Pathways Implicated in Male Genitalia Differentiation

ABSTRACT

Background. Hypospadias is the most common malformation affecting the male genitalia. Although the causes remain often unknown, endocrine, vascular and environmental factors have been implicated. However, the genetic basis is probably underestimated.

Objectives. To study the genetic factors implicated in sexual differentiation.

Methods. A cohort of 284 children born with hypospadias has been established since 2011. DNA was extracted from blood lymphocytes and fibroblasts obtained after a foreskin biopsy. Sanger sequencing of *AR*, *MAMLD1* and *NR5A1*, SNP-array analysis, and Whole Exome Sequencing (WES) were performed. A second cohort of 1,311 pregnant women was established to evaluate an association between maternal fhCGb and hypospadias.

Results. No mutation in *AR* and *MAMLD1* was found. Non-described variations of *AR*, *MAMLD1* and *NR5A1* were identified without any splicing activity. Some polymorphisms in *AR* gene had a MAF significantly higher ($p < 0.01$). A heterozygous intragenic duplication of *NR5A1* was found. Pangenomic analysis included 35 anomalies (15.7%) that could be a potential cause of isolated, distal, non-hereditary hypospadias encompassing 25 candidate genes. 22 variants was classified as pathogenic on WES. Finally, a significant difference of fhCGb for severe types was identified even after adjustment for placenta dysfunction ($p < 0.03$).

Conclusion. Our hypothesis about "somatic" mutations in 3 candidate genes was not ascertained. However, pangenomic analysis found 15.7% anomalies which could be likely linked to hypospadias. The use of WES could be an attractive method for exploring further these results as we identified 22 variants in 30 cases of familial hypospadias.

Keywords. Hypospadias; Disorders of Sex Development, 46,XY; Genetics; Child; Whole Exome Sequencing; Chorionic Gonadotropin, beta Subunit, Human; Polymorphism, Single Nucleotide; Receptors, Androgen; Steroidogenic Factor 1.

DISCIPLINE : Thèse de doctorat – Thèse d'Université – Génétique Humaine