

Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 106/D3C/2021

N° de série : 06/BA/2021



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Option : **Génétique moléculaire**

Présentée et soutenue par :

ZIDOUNE Housna

Le 16 / 12 /2021

Intitulé

**Etude cytogénétique et moléculaire des désordres
du développement sexuel**

Président du jury

SATTA Dalila

Pr. Université Frères Mentouri, Constantine 1

Directeur de thèse

CHELLAT Djalila

Pr. Université Frères Mentouri, Constantine 1

Co-directeur

MCELREAVEY Kenneth

Dr. Institut Pasteur, Paris, France

Examineurs

ABADI Nouredine

Pr. Université Salah Boubnider, Constantine 3

CHAOUI Naouel

Pr. Université Frères Mentouri, Constantine 1

**Année universitaire
2021-2022**

Sommaire

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

1

Chapitre I. Développement sexuel

1. Détermination gonadique	3
2. Gonade indifférenciée ou bipotentielle	5
2.1 Détermination et différenciation testiculaire	5
2.2 Détermination et différenciation ovarienne	6
3. Développement des voies génitales et des organes génitaux externes	7
3.1 Stade indifférencié	7
3.2 Différenciation masculine	9
3.3 Différenciation féminine	10

Chapitre II. Régulation génétique de la détermination sexuelle

1. Gonade bi-potentielle	11
1.1 <i>GATA binding protein 4 (GATA4)</i>	12
1.2 <i>LIM homeobox 9 (LHX9)</i>	12
1.3 <i>Wilms tumor 1 (WT1)</i>	13
1.4 <i>Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1 (NR5A1)</i>	14
1.5 <i>Chromobox homologue 2 (CBX2)</i>	14
1.6 <i>Empty spiracles homeobox 2 (EMX2)</i>	15
2. Détermination testiculaire	15
2.1 Facteurs de transcription SOX (<i>SRY-related high-mobility group (HMG) box</i>)	15
2.1.1 <i>Sex-determining region on Y (SRY)</i>	16
2.1.2 <i>SRY-related HMG box 9 (SOX9)</i>	16
2.1.3 Autres gènes SOX	18
2.2 <i>NR5A1</i>	18
2.3 <i>Doublesex and mab-3-related transcription factor 1 (DMRT1)</i>	19
3. Détermination ovarienne	20
3.1 <i>FOXL2</i>	20
3.2 Voie de signalisation canonique Rspo1/Wnt4/ β -caténine	21

Chapitre III. Anomalies du développement sexuel

1. DSD 46,XY	24
1.1 Anomalies du développement testiculaire	24
1.1.1 Dysgénésie gonadique complète (DGC) et partielle (DGP)	24
1.1.2 Régression gonadique	25
1.1.3 DSD ovotesticulaire (DSD OT)	26
1.2 Anomalies de synthèse/action des androgènes	27
1.2.1 Anomalies de biosynthèse des androgènes	27

1.2.2 Anomalies d'action des androgènes	28
1.2.3 Hypoplasie des cellules de Leydig (HCL)	28
1.2.4 Syndrome de persistance des dérivés müllériens 46,XY	29
1.3 Hypospadias	30
1.4 Cryptorchidie	31
1.5 Troubles syndromiques complexes	31
2. DSD 46,XX	31
2.1 Anomalies du déterminisme ovarien	31
2.1.1 DSD ovotesticulaire 46,XX (DSD OT 46,XX)	31
2.1.2 DSD testiculaire 46,XX (DSD T 46,XX)	32
2.1.3 Dysgénésie ovarienne	32
2.2 Défauts de synthèse des stéroïdes (excès d'androgènes)	33
2.2.1 Excès d'androgènes fœtaux	33
2.2.2 Excès d'androgènes fœtoplacentaires	34
2.2.3 Excès de production d'androgènes chez la mère	34
Chapitre IV Traitement et prise en charge	
1. Traitement hormonal	35
2. Traitement chirurgical	37
3. Prise en charge psychologique	37
Partie pratique	
Patients et méthodes	
1. Recrutement des patients	38
2. Méthodes	39
2.1 Prélèvements sanguins	39
2.2 Analyse cytogénétique	39
2.3 Analyse moléculaire	40
2.3.1 Extraction de l'ADN génomique	40
2.3.2 PCR du gène <i>SRY</i>	41
2.3.3 Préparation des échantillons pour le WES	44
2.3.4 Séquençage de l'exome entier « WES »	45
2.3.5 Analyse des données du WES	46
2.3.6 Séquençage Sanger	50
Résultats et discussion	
1. Vue globale de la cohorte	52
1.1 Répartition des patients selon leur origine	52
1.2 Répartition des patients selon les données cliniques et moléculaires	52
1.3 Répartition des patients selon la consanguinité	55
2. Etude cytogénétique	55
3. Analyse du WES et évaluation de la pathogénicité	56
3.1 Gènes prédominants dans la cohorte	57
3.1.1 Gènes liés aux DSD	58

3.1.2 Gènes liés à l’HHC	60
3.1.3 Gènes liés aux phénotypes somatiques	61
3.2 Etiologie moléculaire indéterminée	63
3.3 Diagnostic moléculaire chez les patients séquencés avec ou sans parent(s)	63
3.4 Détermination de variants de gènes liés à l’HHC dans les phénotypes de DSD 46,XY	64
3.5 Identification de variants causaux, communs entre les patients	65
3.5.1 PROKR2	65
3.5.2 CHD7	66
3.5.3 SRD5A2	66
3.5.4 DHX37	66
3.5.5 HSD17B3	66
3.6 Identification de plus d’un variant causal pour le même patient	67
3.7 Nouveaux variants géniques associés aux DSD	68
3.8 Identification des variants génétiques dans les DSD syndromiques/non syndromiques 46,XY	69
3.9 Identification des VSI dans les DSD 46,XY	69
3.9.1 VSI dans le gène <i>NR2F2</i>	69
3.9.2 VSI identifiés chez des jumeaux monozygotes discordants pour le phénotype DSD	70
3.10 Cas familiaux de DSD 46,XY	73
3.10.1 Première famille	73
3.10.2 Deuxième famille	75
3.10.3 Troisième famille	78
3.10.4 Quatrième et cinquième familles	79
3.11 DSD 46,XX	79
Conclusion et perspectives	81
Références bibliographiques	83
Annexes	
Résumés	
Publication	

Remerciements

Cette thèse, une aventure particulière par laquelle j'ai découvert le monde merveilleux de la recherche, univers complexe mais très passionnant. J'ai vécu une expérience très enrichissante ayant le plaisir d'apprendre sans cesse au niveau de la lecture scientifique autant qu'au niveau des manipulations. J'ai eu la chance de rencontrer des personnes qui m'ont apporté énormément sur le plan scientifique autant que sur le plan humain et qui méritent aujourd'hui mes profondes considérations.

Mes remerciements s'adressent à ma directrice de thèse, Professeur Djilila CHELLAT-REZGOUNE, pour avoir accepté de diriger ce travail et de m'avoir fait confiance pour réaliser ce projet de thèse aussi pertinent et passionnant. Son soutien, ses compétences et sa clairvoyance m'ont été d'une aide inestimable.

Je suis heureuse d'exprimer ma profonde gratitude à mon co-directeur de thèse, Docteur Kenneth MCELREAVEY, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour la qualité de son encadrement. J'ai pu, grâce à sa rigueur, disposer de données fiables ayant permis la réussite de ce travail de recherche.

Je tiens à remercier les personnes ayant accepté de faire partie de mon jury de thèse, pour l'intérêt et le regard critique constructif qu'ils porteront sur mon travail de recherche. Merci Professeur Dalila SATTA pour avoir accepté de juger ce travail et m'honorer par votre présidence du jury. Je remercie Professeur Noureddine ABADI et Professeur Naouel CHAOUI qui me font l'honneur d'avoir accepté d'y participer en tant qu'examineurs. Je tiens à vous tous exprimer ma respectueuse considération et ma sincère gratitude. Votre examen de cette thèse et des travaux qui y sont présentés sera un privilège.

Je remercie vivement toute l'équipe de recherche du laboratoire de Génétique du développement humain-Institut Pasteur-Paris : Docteur Anu BASHAMBOO, Docteur Denis HOUZELSTEIN et Docteur Caroline EOZENOU pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée durant mon parcours.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame Joëlle BIGNON-TOPALOVIC pour son précieux concours technique et la sympathie qu'elle m'a témoignée ; grâce à elle, j'ai trouvé une ambiance de travail agréable.

Je suis particulièrement heureuse de pouvoir remercier tous cliniciens, infirmiers et laborantins des hôpitaux (Constantine, Alger et Jijel) et de l'université Frères MENTOURI Constantine1, qui étaient toujours disponibles pour un coup de main ou un conseil.

Mes remerciements vont particulièrement aux : Docteur Asma BOUKRI, Professeur Asmahane LADJOUZE, Professeur Scheher Aman DIB, Professeur Karima SIFI, Docteur Ali SEDIRA, Docteur Kamel AMIMOUR, Docteur Mohammed NIBOUCHE, Docteur Faïza BOUMEGOURA, Docteur MESKALDJI, Docteur Abdelmalek BOUARROUDJ, Docteur Nourelhouda SALMI, Docteur Lyes SAKHRI, à tata Yasmina et Sihem pour leur aide et sympathie.

Merci aux patients et leurs parents, grâce à eux, cette thèse n'aurait pu être menée à bien.

Enfin, je remercie très vivement mon gouvernement qui m'a accordé la bourse d'études PNE 2019-2020 pour effectuer ce travail de recherche.

Liste des abréviations

ACMG	american college of medical genetics and genomics
ADS	anomalies du développement sexuel
AKR1C3	aldo-ketoreductase family 1 member C3
AKR1C4	aldo-ketoreductase family 1 member C4
AMH	anti-müllerian hormone
AMH	anti müllerian hormone
ANOS1	anosmin 1
AR	androgen receptor
ATP7B	ATPase coppertransporting beta
BBP	bleu de bromo phénol
BBS12	Bardet-Biedl syndrome 12
BBS7	Bardet-Biedl syndrome 7
BET	bromure d'éthidium
BMP15	bone morphogenetic protein 15
CACNA1F	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 F
CBX2	chromobox homologue 2
CCDC141	coiled-coildomaincontaining 141
CG	cellules germinales
CGP	cellules germinales primordiales
CHD7	chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7
COL1A1	collagen Type I Alpha 1 chain
COL2A1	collagen type II alpha 1 chain
COUP-TFII	chicken ovalbumin promoter transcription factor II
CTNNB1	catenin, beta-1
CTU2	cytosolicthiouridylasesubunit 2
CYB5A	cytochrome b5 type A
CYP21A2	cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2
DCAF17	DDB1 and CUL4 associated factor 17
ddNTP	didésoxyribonucléotides
DGC	dysgénésie gonadique complète
DGKK	diacylglycerol kinase kappa
DGP	dysgénésie gonadique partielle
DHH	desert Hedgehog signaling molecule
DHT	dihydrotestostérone
DHX37	DEAH-box helicase 37
DMRT1	doublesex and mab-3 related transcription factor 1
dNTP	désoxyribonucléotides
DSD	disorders of sexual development
DSDOT	DSD ovotesticulaire
DSDT	DSD testiculaire
DUSP6	Dual specificity protein phosphatase 6
EDTA	ethylene diamine tetra-acetic acid

EMX2	empty spiracles homeobox 2
ExAC	exomeaggregation consortium
FANCB	FA complementation group B
FANCD2	FA complementation group D2
FEZF1	FEZ family zinc finger 1
FGF9	fibroblast growth factor 9
FGFR1	fibroblastgrowth factor receptor 1
FGFR2	fibroblastgrowth factor receptor 2
FGFR3	fibroblastgrowth factor receptor 3
FIGLA	folliculogenesis specific bHLH transcription factor
FLNA	filamin A
FLRT3	fibronectin Leucine RichTransmembraneProtein 3
FMR1	fragile X mental retardation 1
FOXL2	forkhead box L2
FOXP1	forkhead box protein P1
FSH	follicle stimulating hormone
FSHB	follicle stimulating hormone subunit beta
FSHR	follicle stimulating hormone receptor
GATA4	GATA binding protein 4
GHR	growth hormone receptor
GHRHR	growth hormone releasing hormone receptor
GLI2	GLI family zinc finger 2
GLI3	GLI Family zinc finger 3
gnomAD	genomeaggregationdatabase
GnRH	gonadotropin releasing hormone
GNRHR	gonadotropin releasing hormone receptor
GPC3	glypican 3
GPRC6A	G-protein coupled receptor family C group 6 member A
hCG	human chorionic gonadotropin
HCS	hyperplasie congénitale des surrénales
HHAT	Hedgehog acyltransferase
HHC	hypogonadisme hypogonadotrope congénital
HMG	high-mobility group
HOXA13	homeobox A13
HS6ST1	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1
HSD17B3	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 3
HSD17B6	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 6
InDel	insertion-délétion
INSL3	insulin like 3
KAT6B	lysine acetyltransferase 6B
KTS	lysine, threonine, serine
LF	cellules de Leydig fœtales
LH	luteinizing hormone
LHCG	luteinizing hormone/choriogonadotropinreceptor

LHCGR	luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor
LHX3	LIM homeobox 3
LHX4	LIM homeobox 4
LHX9	LIM homeobox 9
LZTR1	leucine zipper like transcription regulator 1
MAMLD1	mastermind like domain containing 1
MAP3KA	mitogen-activated protein kinase kinasekinase 3
MP	cellules myoïdespéritubulaires
MPDZ	multiple PDZ domaincrumbscellpolaritycomplex component
MYRF	myelinregulatory factor
NGLY1	N-glycanase 1
NGS	next generation sequencing
NIPBL	nipped-B-likeprotein
NOBOX	newborn ovary homeobox
NR0B1	nuclear receptor subfamily 0 group B member 1
NR2F2	nuclear receptor subfamily 2 group F member 2
NR5A1	nuclear receptor subfamily 5 group A member 1
NRAS	neuroblastoma RAS
OFD1	OFD1 centriole and centriolar satellite protein
OGE	organes génitaux externes
OGI	organes génitaux internes
OMIM	online mendelian inheritance in man
PBX1	PBX homeobox 1
PGD2	prostaglandin D2
PLXNA3	plexin A3
PolyPhen	polymorphismphenotyping
POR	cytochrome P450 oxidoreductase
PPP2R3C	protein phosphatase 2 regulatory subunit B gamma
PRKAR1A	protein kinase CAMP-dependent type I regulatory subunit alpha
PROK2	prokineticin 2
PROKR2	prokineticinreceptor 2
PROP1	PROP paired-likehomeobox 1
PSMD12	proteasome 26S subunit, non-ATPase 12
PTCH1	patched 1
REVEL	rare exome variant ensemble learner
RNF216	ring fingerprotein 216
RNF43	ring finger protein 43
ROR2	Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2
RSPO1	R-spondin 1
RXFP2	relaxin family peptide receptor 2
SCLY	selenocysteine Lyase
SEMA3A	semaphorin 3A
SEMA3F	semaphorin 3F
SF1	steroidogenic factor 1

SHH	sonichedgehog
SICA	syndrome d'insensibilité complète aux androgènes
SIFT	sortingtolerantfromtolerant
SLC29A3	solute carrier family 29 member 3
SOPK	syndrome des ovaires polykystiques
SOS1	son of sevenlesshomolog 1
SOX10	SRY-box transcription factor 10
SOX3	SRY-box transcription factor 3
SOX8	SRY-box transcription Factor 8
SOX9	SRY-box transcription factor 9
SPRY4	sprouty RTK signalingantagonist 4
SRA1	steroidreceptor RNA activator 1
SRD5A2	steroid 5 alpha-reductase 2
SRD5A2	steroid 5 alpha-reductase 2
SRY	sex-determining region of Y chromosome
TA	tunique albuginée
TBE	tris borate EDTA
TESCO	testis-specific core element
TGIF1	TGFB induced factor homeobox 1
VC	vaisseau cœlomique
VCF	variant calling format
VEGFA	vascular endothelial growth factor A
VEGFB	vascular endothelial growth factor B
VEGFR1	vascular endothelial growth factor receptor 1
WES	whole exome sequencing
WNT/β-caténine	Wingless-type MMTV integration site family member/ β -caténine
WNT4	Wnt family member 4
WT1	Wilms tumor 1
ZFPM2	zinc finger protein, FOG family member 2
ZNRF3	zinc and ring finger 3
Δ4A	Δ 4 androsténédione

Liste des figures

Figure 1	Parcours migratoire des CGP lors du développement embryonnaire	4
Figure 2	Organisation du testicule fœtal	6
Figure 3	Développement des organes génitaux internes mâles et femelles chez les mammifères	8
Figure 4	Résumé des principaux évènements moléculaires dans la détermination/différenciation gonadiques chez les mammifères	11
Figure 5	Voie de signalisation WNT/ β -caténine canonique	21
Figure 6	Biosynthèse des hormones stéroïdes dans les gonades (testicules et ovaires)	27
Figure 7	Périodes optimales pour effectuer un dosage hormonal	36
Figure 8	Profil électrophorétique de la PCR d'une séquence de 272 pb du gène <i>SRY</i>	42
Figure 9	Schéma commun pour la méthodes d'enrichissement de l'exome entier basée sur l'hybridation des séquences cibles	45
Figure 10	Exemplaire d'une partie d'un fichier VCF sous format d'un tableau Excel indiquant les champs indispensables pour la description d'un nombre de SNP déterminés chez un patient	46
Figure 11	Exemplaire d'une partie d'un fichier VCF indiquant les paramètres d'un nombre de SNP déterminés chez un patient	47
Figure 12	Exemplaire d'une comparaison de la liste des SNP des gènes d'un patient avec celles de ses parents en utilisant l'outil <i>multiple list comparator</i>	49
Figure 13	Exemple d'électrophérogrammes obtenus d'une séquence du gène <i>DHX37</i> présentant un variant (p.R308Q) à l'état hétérozygote chez un patient transmis par sa mère et absent chez son père	52
Figure 14	Répartition des patients en fonction de leurs origines	52
Figure 15	Répartition des patients selon les motifs de découverte du DSD	53
Figure 16	Répartition des patients selon les phénotypes DSD 46,XY et DSD 46,XX	54
Figure 17	Distribution et classification des variants identifiés en fonction des 5 niveaux de pathogénicité dans 84 gènes	57
Figure 18	Distribution des variants précédemment rapportés et non rapportés dans la littérature	68
Figure 19	Pedigree et ségrégation représentatifs des 3 variants dans les gènes <i>CDC141</i> , <i>SCLY</i> et <i>VEGFB</i> chez les 2 frères jumeaux monozygotes ainsi que leurs parents	71
Figure 20	Pedigree et ségrégation représentatifs des 2 variants dans les gènes <i>FANCD2</i> et <i>FGFR2</i> chez le patient 9, son père et sa mère	74

- Figure 21** Pedigree et ségrégation représentatifs des 5 variants dans les gènes *DCAF17*, *FEZF1*, *MAMLD1*, *RXFP2* et *PROKR2* chez le patient 114, sa sœur, ses parents ainsi que ses 2 oncles affectés 75
- Figure 22** Pedigree et ségrégation représentatifs du variant identifié dans le gène *SOS1* chez la patiente 82, ses 2 frères affectés et leurs parents 78

Liste des tableaux

Tableau 1	Classification des DSD selon le consensus de Chicago	23
Tableau 2	Amorces utilisées pour la PCR d'un amplicon de 272 pb du gène <i>SRY</i>	41
Tableau 3	Constituants du milieu réactionnel pour la PCR du gène <i>SRY</i>	41
Tableau 4	Résumé de l'ensemble des échantillons d'ADN collectés et analysés	44
Tableau 5	Composants du milieu réactionnel pour les PCR des gènes à séquencer	50
Tableau 6	Distribution des 125 patients ainsi que les variants identifiés en fonction des différents niveaux de pathogénicité et catégories de DSD	56
Tableau 7	Résumé de l'ensemble des échantillons d'ADN séquencés pour un nombre de variants testés	64
Tableau 8	Distributions des variants des gènes présents chez plus d'un individu	65

Introduction

Les anomalies du développement sexuel «ADS» ou *disorders of sexual development* «DSD» selon l'acronyme anglo-saxons, sont définies comme des conditions congénitales hétérogènes dans lesquelles le sexe chromosomique, gonadique ou anatomique est discordant, entraînant ainsi, un large éventail de phénotypes liés aux variations génétiques, à la programmation du développement gonadique/génital et au système endocrinien (Hughes *et al.*, 2006 ; Ostrer, 2014).

Bien que les données disponibles sur la prévalence exacte des DSD soient très limitées, l'incidence est estimée à 1 pour 4 500–5 500 naissances vivantes dans les pays européens. En revanche, elle est à 1 pour 2 500-3 000 dans certaines communautés arabes, en raison de la consanguinité et de l'endogamie (Abdullah *et al.*, 1991 ; Sax, 2002 ; Thyen *et al.*, 2006 ; Mazen *et al.*, 2008 ; Bashamboo et McElreavey, 2014). Cependant, l'incidence des DSD peut être plus élevée en raison de l'absence d'un diagnostic précis ou d'un diagnostic tardif dans de nombreux cas se présentant à la puberté ou à l'âge adulte avec une gynécomastie, un utérus primordial, une aménorrhée primaire, des troubles de la fertilité ou des signes de malignité gonadique (Bashamboo et McElreavey, 2016 ; Acién et Acién, 2020). De ce fait, la corrélation génotype-phénotype peut être difficile à gérer cliniquement pour certains types de DSD en raison de la diversité de ces conditions chez les individus affectés (Li *et al.*, 2020). L'incertitude quant à l'assignation du sexe peut être traumatisante à la fois pour l'individu et pour les membres de sa famille. Par conséquent, l'établissement d'un diagnostic génétique peut contribuer à l'acceptation de l'identité sexuelle et fournir des conseils et des orientations essentiels pour la gestion clinique (Jørgensen *et al.*, 2015 ; Van der Zwan *et al.*, 2015).

Le diagnostic moléculaire du DSD est un défi de longue date et jusqu'à récemment, il n'était disponible que pour une petite minorité de personnes atteintes de DSD (Arboleda *et al.*, 2013 ; Parivesh *et al.*, 2019). L'établissement d'un diagnostic génétique précis peut fournir des conseils et des orientations essentiels pour la gestion clinique, notamment en ce qui concerne le risque de malignité (Jørgensen *et al.*, 2015 ; Van der Zwan *et al.*, 2015).

Les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS ; *next generation sequencing*) ont amélioré le rendement diagnostique des anomalies congénitales, dont les DSD. Le séquençage ciblé, utilisant un ensemble de gènes liés aux DSD, a un rendement diagnostique de 30 à 47% dans les cas de DSD 46,XY (Buonocore *et al.*, 2019 ; Hughes *et al.*, 2019). Des panels de gènes plus importants ont permis d'obtenir un rendement

diagnostique de 46,9% des patients DSD 46,XY et de 10,3% des patients DSD 46,XX (Xu *et al.*, 2019).

La technologie NGS dont le séquençage de l'exome entier (WES ; *whole exome sequencing*) a amélioré les capacités de diagnostic génétique du DSD dans différents travaux scientifiques. En utilisant uniquement l'approche WES, Abualsaud *et al.* (2020), ont identifié des variants géniques potentiellement causaux dans 42 gènes portés par 51% de la cohorte de 149 patients avec DSD (Abualsaud *et al.*, 2020).

De nouveaux facteurs génétiques impliqués dans l'apparition du phénotype DSD continuent à être identifiés. Au cours des cinq dernières années, le séquençage de l'exome et du génome a conduit à la découverte de nouveaux gènes à l'origine des formes syndromiques et non syndromiques de DSD 46,XY et DSD 46,XX. Il s'agit notamment des gènes *DHX37*, *HHAT*, *LHX9*, *MYRF*, *NR2F2*, *PBX1*, *PPP2R3C*, *SOX8* et *ZNRF3* (Callier *et al.*, 2014 ; Bashamboo *et al.*, 2018 ; Harris *et al.*, 2018 ; Portnoi *et al.*, 2018 ; Eozenou *et al.*, 2019 ; Guran *et al.*, 2019 ; Hamanaka *et al.*, 2019 ; Kunitomo *et al.*, 2020 ; McElreavey *et al.*, 2020).

L'objectif général de cette étude est de rechercher les variants géniques à l'origine de cas de DSD dans la population algérienne, largement inexplorée pour les anomalies du développement sexuel.

Objectifs spécifiques :

- confirmer la présence ou l'absence du gène *SRY* dans les cas DSD 46,XY et DSD 46,XX,
- dépister les variants causaux des gènes liés aux DSD en analysant les données du WES,
- décrire de nouveaux gènes pouvant être impliqués dans les présentations cliniques atypiques,
- confirmer la présence de ces variants chez le patient, ses parents et sa fratrie (si présents) par le séquençage Sanger,
- déterminer la corrélation génotype-phénotype dans les diverses catégories de DSD.

Bibliographie

Chapitre I

Développement sexuel

Le développement sexuel humain est un processus séquentiel, chronologique et continu dépendant de divers facteurs génétiques et hormonaux, qui débute dès la fécondation du gamète maternel, l'ovocyte II, par le gamète paternel, le spermatozoïde, et se poursuit jusqu'à la puberté lorsque l'apparence sexuelle adulte est acquise. Ce phénomène est divisé en deux catégories, à savoir la détermination du sexe désignant le développement de la gonade bipotentielle vers un ovaire ou un testicule, et la différenciation du sexe impliquant une série d'évènements par lesquels les gonades et les organes génitaux sexuellement indifférenciés acquièrent progressivement des caractéristiques masculines ou féminines (Josso, 1988 ; She et Yang, 2014 ; Rey *et al.*, 2020).

Dès la fécondation, le sexe génétique du futur embryon est déterminé par les gamètes parentaux : si l'œuf fécondé est conçu de deux chromosomes X, le sexe génétique de l'embryon sera féminin, si l'œuf est conçu d'un chromosome X et d'un chromosome Y, le sexe génétique de l'embryon sera masculin. Cette constitution chromosomique impose ensuite la différenciation des gonades, qui se met en place pendant la vie fœtale. Les embryons de sexe génétique féminin, présentent un développement ovarien tandis que les embryons de sexe génétique masculin, présentent un développement testiculaire. Une fois la gonade femelle ou mâle est fonctionnelle, elle influence le développement des voies génitales et des organes génitaux externes (OGE) féminins ou masculins, permettant ainsi la mise en place du sexe phénotypique, cliniquement identifié (Jost, 1972 ; Gilbert, 2003 ; She et Yang, 2014).

1. Détermination gonadique

La mise en place de l'appareil génital féminin ou masculin commence très tôt, dès la 3^{ème} semaine du développement embryonnaire, par la formation de la gonade indifférenciée qui est divisée en deux phases principales : une phase initiale définie par la détermination de la gonade bipotentielle et une seconde phase caractérisée par la différenciation vers un testicule ou un ovaire (Hyon et Rouen, 2013).

La formation de la gonade primitive ou bipotentielle débute au cours de la 4^{ème} semaine du développement embryonnaire par la prolifération des cellules de l'épithélium cœlomique et des cellules mésenchymateuses sous-jacentes, donnant naissance aux crêtes génitales (ou gonadiques), qui apparaissent sous forme d'un épaississement de l'épithélium cœlomique sur la partie ventrale et médiane du mésonéphros (Karl et Capel, 1998 ; Albrecht et Eicher, 2001 ; Encha-Razavi et Escudier, 2008).

Dans un second temps, les crêtes gonadiques sont colonisées par les cellules germinales primordiales (CGP), d'origine épiblastique, formées dès le 10^{ème}-11^{ème} jour du développement embryonnaire et qui migrent à la paroi postérieure de la vésicule vitelline près de l'allantoïde entre la 3^{ème} et la 4^{ème} semaine de la vie embryonnaire, ensuite se dirigent vers les crêtes génitales au cours de la 5^{ème} et la 6^{ème} semaine de développement, en passant le long de la paroi du tube digestif postérieur puis à travers le mésentère dorsal. A ce stade, la gonade bipotentielle, composée d'un cortex externe et d'une médulla interne, est prête à se différencier en un testicule ou un ovaire, et les CGP entraînent la prolifération des cellules épithéliales cœlomiques qui vont entourer les cellules germinales et former les futurs cordons sexuels primaires (Figure 1) (Lawson et Hage, 1994 ; Rey *et al.*, 2020 ; De Felici, 2013 ; Kalfa *et al.*, 2015).

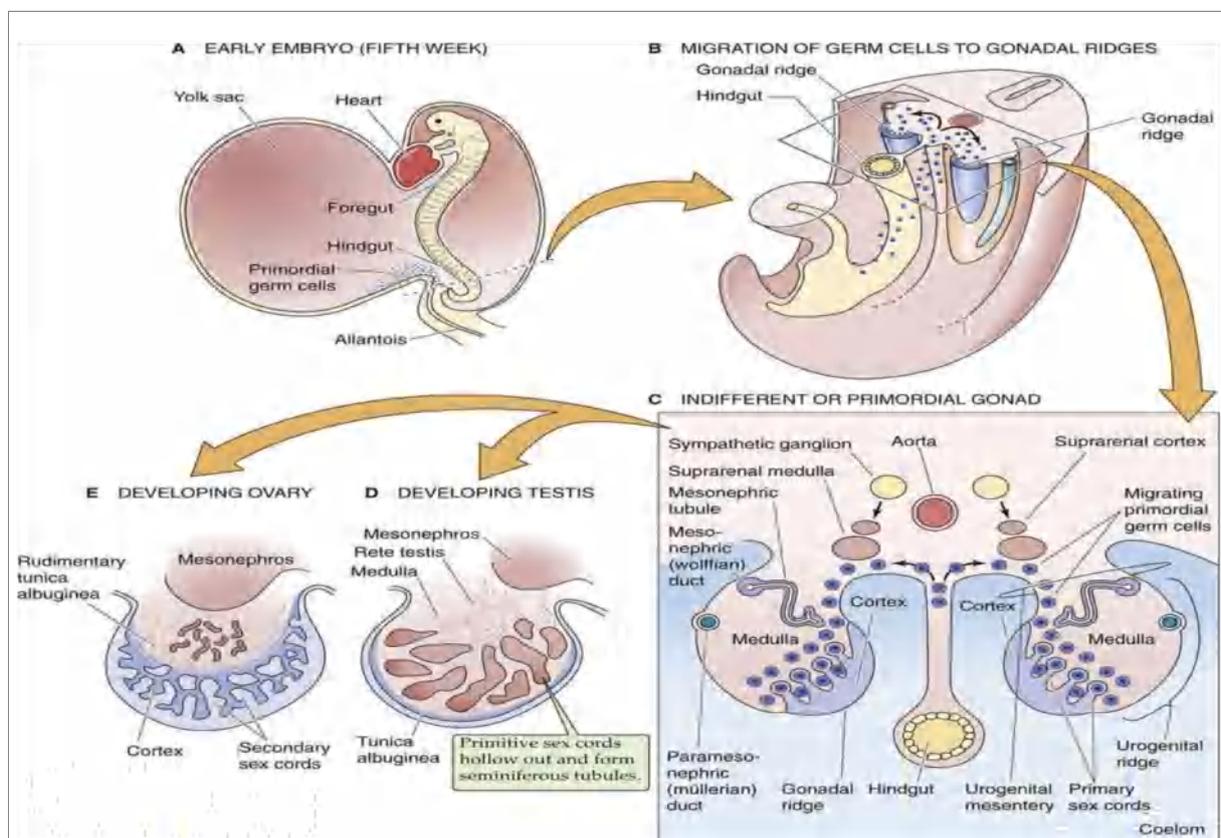


Figure 1. Parcours migratoire des CGP lors du développement embryonnaire (Boron et Boulpaep, 2017)

- (A) Les CGP naissent dans l'endothélium endodermique du sac vitellin
- (B) Les CGP migrent le long du mésentère de l'intestin postérieur et atteignent la crête gonadique
- (C) La gonade indifférenciée est constituée d'un cortex externe et d'une médulla interne
- (D) Le testicule se développe à partir de la médulla de la gonade indifférenciée et le cortex régresse
- (E) L'ovaire se développe à partir du cortex de la gonade indifférenciée et la médulla régresse

2. Gonade indifférenciée ou bipotentielle

Trois types cellulaires distincts composent les crêtes gonadiques : deux lignées de cellules somatiques et une lignée de cellules germinales dont chaque lignée possède une double potentialité dans la différenciation cellulaire vers la voie mâle ou femelle (Munger *et al.*, 2013 ; Lin et Capel, 2015) :

- les cellules de soutien, à l'origine des cellules de Sertoli dans le testicule, et des cellules de la granulosa dans l'ovaire,
- les cellules stéroïdogènes, ce sont principalement les cellules de Leydig dans le testicule, et les cellules de la thèque dans l'ovaire,
- les cellules germinales, précurseurs des spermatozoïdes et des ovocytes.

2.1 Détermination et différenciation testiculaire

Dès la 7^{ème} semaine de la vie embryonnaire, le développement testiculaire initie par la différenciation des cellules somatiques de la gonade indifférenciée en cellules pré-sertoliennes. Ces dernières, s'associent les unes aux autres par des jonctions cellulaires et entourent les CGP pour former les cordons séminifères. Au cours de cette phase, les cellules pré-Sertoliennes changent de morphologie et de localisation, d'un aspect de cellules mésenchymateuses localisées au sein des cordons, à un aspect polarisé de cellules épithéliales à la base des cordons (Wilhelm *et al.*, 2007 ; Svingen et Koopman, 2013 ; Boron et Boulpaep, 2017).

Peu après la différenciation des cellules de Sertoli, les cellules de Leydig fœtales présentes dans l'interstitium avec d'autres types cellulaires (mésenchymateux, immunitaires, nerveux et endothéliaux), se différencient à partir des cellules du mésenchyme ayant probablement une origine double : l'épithélium cœlomique et le mésonéphros. Vers la 10^{ème} semaine, les cellules de Leydig synthétisent les hormones stéroïdiennes testiculaires pour initier la différenciation des voies génitales et des organes génitaux externes masculins, en collaboration avec les cellules de Sertoli (DeFalco *et al.*, 2011 ; Boron et Boulpaep, 2017).

En outre, les cellules provenant de l'épithélium cœlomique participent à l'augmentation du volume de la gonade, tandis que les cellules issues du mésonéphros contribuent à la mise en place de la compartimentation gonadique, des cordons testiculaires et la structuration de la vascularisation testiculaire. Ces cellules vont de plus se différencier en cellules myoïdes

péritubulaires, qui, avec les cellules de Sertoli, se localisent à la base des cordons séminifères et les renforcent pour assurer la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères à la puberté (Martineau *et al.*, 1997 ; Karl et Capel, 1998 ; DeFalco *et al.*, 2011).

La tunique albuginée se met en place en parallèle aux précédentes structures, elle est composée de cellules musculaires lisses avec des capacités contractiles. Cette structure est caractérisée par sa fonction de barrière protectrice et par sa régulation du flux sanguin, la température et la pression intra-testiculaire, favorisant la mobilité des spermatozoïdes grâce à ses contractions à la puberté, ainsi le testicule fœtal est composé de deux compartiments : les cordons séminifères et l'espace interstitiel (Figure 2) (Middendorff *et al.*, 2002).

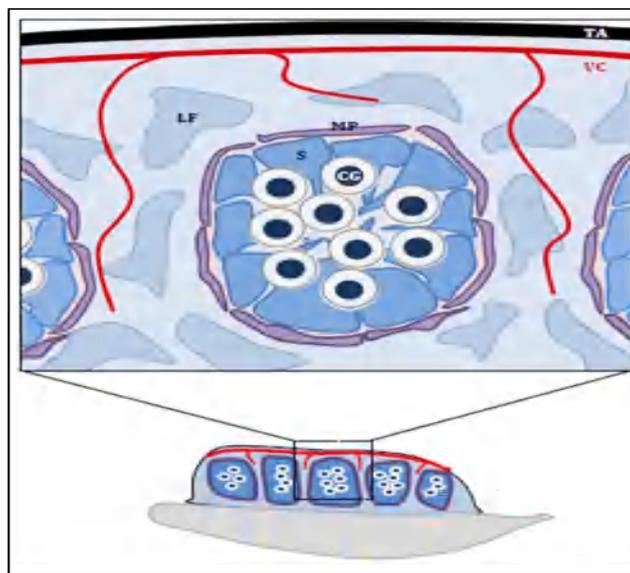


Figure 2. Organisation du testicule fœtal (El Zaiat, 2015)

CG : cellules germinales, LF : cellules de Leydig fœtales, MP : les cellules myoïdes péritubulaires, S : cellules de Sertoli, TA : tunique albuginée, VC : le vaisseau cœlomique

2.2 Détermination et différenciation ovarienne

Le développement de l'ovaire est plus tardif que le développement du testicule, il débute au cours de la 8^{ème} semaine par 2 phénomènes : une évanescence des premiers cordons sexuels formant des cordons médullaires au centre de la gonade qui se fragmentent en amas irréguliers, puis dégèrent et laissent place à un tissu conjonctif lâche. Dans ce dernier, de nombreux vaisseaux sanguins se développent avec une poussée secondaire des cordons sexuels dans le cortex, dans lesquelles vont migrer les CGP. Ainsi, les deux zones, la corticale contenant les cordons sexuels et la médullaire, sont distinctes vers la 12^{ème} semaine de développement (Baillet et Mandon-Pepin, 2012).

Les CGP se transforment en ovogonies qui se lient par des ponts cytoplasmiques afin d'assurer la synchronisation des mitoses précocement au cours de la 8^{ème} - 10^{ème} semaine, et entrent ensuite spontanément en première division de la méiose pour former les ovocytes I (Bendsen *et al.*, 2005 ; Baillet *et al.*, 2011). Ces derniers stimulent la différenciation des cellules de soutien qui les entourent en cellules de la granulosa formant les follicules primordiaux. Une perte massive d'ovocytes s'accompagne, et un tiers des ovocytes seulement vont former des follicules primordiaux. Le nombre des ovocytes, qui est de 7 millions à 5 mois de grossesse, diminue jusqu'à environ 2 millions à la naissance, et ces cellules restent ensuite bloquées en prophase de première division de méiose jusqu'à la puberté où ils reprennent leurs divisions (Pepling Spradling, 2001 ; Baillet et Mandon-Pepin, 2012).

3. Développement des voies génitales et des organes génitaux externes

Le développement des voies génitales est étroitement associé au développement du rein et des voies excrétrices, en vue que la crête urogénitale indifférenciée comprend le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros, qui donneront naissance au cortex surrénal, aux systèmes gonadique et urinaire, respectivement (Karl et Capel, 1998 ; DeCherney *et al.*, 2012).

3.1 Stade indifférencié

Jusqu'à la 7^{ème} semaine du développement embryonnaire, les voies génitales, identiques pour les deux sexes, sont constituées de deux paires de canaux indifférenciés issus du mésonéphros qui se développe du 25^{ème} au 30^{ème} jour de gestation en des canaux mésonéphriques « canaux de Wolff » donnant plus tard naissance à l'épididyme, le canal déférent et les vésicules séminales, si le sexe est masculin. Si le sexe est féminin, le mésonéphros constitue les canaux paramésonéphriques « canaux de Müller » du 40^{ème} au 48^{ème} jour de gestation, qui forment ultérieurement les trompes de Fallope, l'utérus et la partie haute du vagin (Figure 3) (Zhu et Imperato-McGinley, 2017 ; Yang *et al.*, 2018).

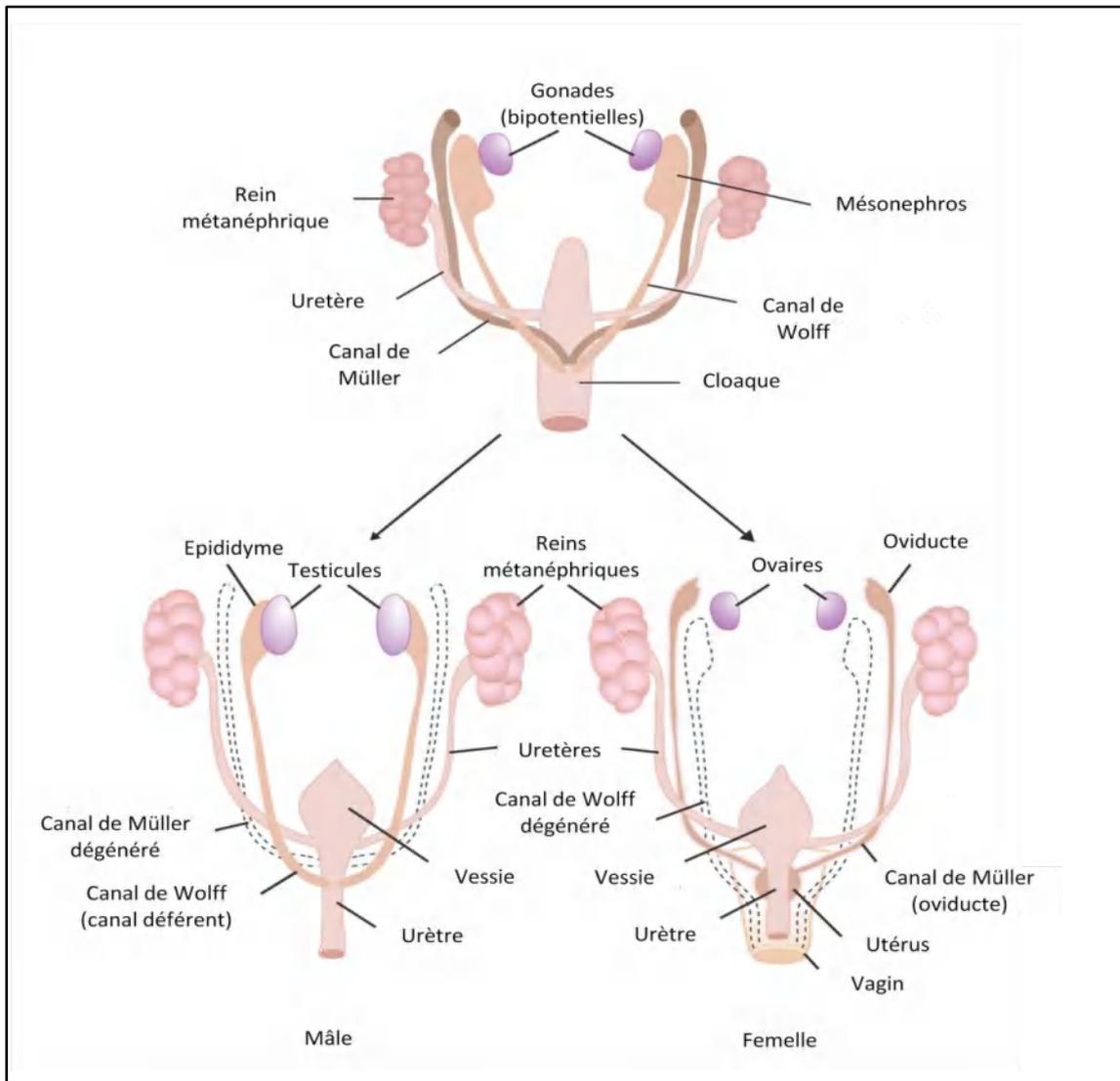


Figure 3. Développement des organes génitaux internes mâles et femelles chez les mammifères (Gilbert, 2003)

Les canaux de Wolff naissent d'un cordon cellulaire plein qui apparaît dès la 4^{ème} semaine de développement, à la partie antérieure du mésoderme intermédiaire qui s'abouche au niveau du cloaque (individualisation du sinus urogénital), puis se tubulise par la suite lors de sa progression. Par ailleurs, l'ensemble du mésonephros régresse et seulement quelques tubules situés en regard de l'ébauche gonadique permettent de relier la gonade aux canaux de Wolff (Mullen et Behringer, 2014 ; Tachdjian *et al.*, 2016).

Vers la 3^{ème}- 4^{ème} semaine de développement, les OGE se forment autour de la membrane cloacale à la confluence des voies génitales et urinaires. Au début de la 5^{ème} semaine, un épaissement du mésenchyme caudal, soulevant l'ectoderme de la membrane cloacale, contribue à la formation des bourrelets cloacaux. Ces derniers fusionnent en avant pour former le tubercule génital (Schoenwolf, 2009 ; Yamada *et al.*, 2003).

A partir de la 6^{ème} semaine, les canaux de Müller se forment latéralement par rapport aux canaux de Wolff, par le mécanisme d'invagination de l'épithélium coelomique qui émerge au niveau du 3^{ème} somite thoracique et progresse caudalement jusqu'à la paroi postérieure du sinus urogénital. Sur leur trajet, ils croisent les canaux de Wolff et se rejoignent pour s'accoler juste avant de s'insérer sur le sinus urogénital au niveau du tubercule de Müller (Schoenwolf, 2009; Tachdjian *et al.*, 2016).

A 8 semaines, le sinus urogénital est séparé du canal ano-rectal et la rupture de la membrane du sinus urogénital laisse apparaître la plaque urétrale autour de laquelle se forment les replis génitaux, situés dans les bourrelets cloacaux, qui prennent le nom de bourrelets génitaux (Yamada *et al.*, 2003 ; Bargy *et al.*, 2008 ; Tachdjian *et al.*, 2016).

3.2 Différenciation masculine

La différenciation des voies génitales et des OGE est sous l'influence des hormones testiculaires qui vont être produites par les cellules de Leydig fœtales et les cellules de Sertoli. Ces dernières, sécrètent l'AMH (anti müllerian hormone) responsable de la régression des canaux de Müller entre la 8^{ème} et la 10^{ème} semaine de développement. Cependant, quelques reliquats müllériens vont persister, notamment au niveau de l'extrémité céphalique (Allard *et al.*, 2000 ; Bargy *et al.*, 2008).

Vers la 8^{ème} - 9^{ème} semaine de gestation, les cellules de Leydig se développent aux dépens du mésenchyme entre les tubes séminifères, et synthétisent la testostérone. Cette hormone permet le maintien et le développement du canal de Wolff qui est à l'origine de l'épididyme, du canal déférent, des vésicules séminales et des canaux éjaculateurs. En revanche, les canaux efférents, proviennent de la prolifération d'une dizaine de tubules mésonéphrotiques situés en regard de la future gonade, à partir de la 9^{ème} semaine. Ces canaux sont ensuite mis au contact des cordons du rete testis afin de relier les cordons séminifères à l'épididyme vers le 3^{ème} mois de développement (Allard *et al.*, 2000 ; Tachdjian *et al.*, 2016).

Par ailleurs, l'allongement du tubercule génital, futur pénis, se fait sous la dépendance de la dihydrotestostérone (DHT), un dérivé de la testostérone. À la fin du 3^{ème} mois, les bourrelets génitaux fusionnent pour former le scrotum dans lequel les testicules migrent, après le 6^{ème} mois de vie fœtale (Hyon et Rouen, 2013).

3.3 Différenciation féminine

L'absence des deux hormones testiculaires, la testostérone et l'AMH, vers la 7^{ème} semaine de développement chez le sexe féminin favorise la différenciation des voies génitales féminines qui débute par la disparition des canaux de Wolff, et le développement des canaux de Müller. La partie crâniale des canaux de Müller donne ensuite naissance au pavillon et à la trompe, tandis que leur partie distale fusionne pour former le canal utérovaginal à l'origine de l'utérus (Hyon et Rouen, 2013).

Le sinus urogénital, au niveau du tubercule de Müller, s'épaissit ensuite en un massif épithélial plein, qui, en association avec le tubercule de Müller forme la plaque vaginale qui se creuse ensuite d'une lumière pour former le vagin, en continuité avec le col utérin (Yamada *et al.*, 2003 ; Schoenwolf, 2009 ; Tachdjian *et al.*, 2016).

L'absence de testostérone, contribue également à un petit allongement du tubercule génital qui régresse par la suite pour former le clitoris. Les bourrelets et les replis génitaux restent séparés et forment respectivement, les grandes et les petites lèvres (Bargy *et al.*, 2008 ; Schoenwolf, 2009).

Chapitre II

Régulation génétique de la détermination sexuelle

La communication intercellulaire assurant le développement embryonnaire dépend de plusieurs facteurs biologiques clés de la différenciation sexuelle humaine, impliquant des cascades d'expression génique, dont les protéines ont des fonctions hautement spécifiques en termes de localisation et de temps (Eggers *et al.*, 2012 ; Munger *et al.*, 2013).

Des expériences fonctionnelles réalisées sur des modèles murins et des études menées chez des patients présentant des anomalies de développement urogénital ont mis en évidence l'implication de certains gènes dans l'épaississement initial de l'épithélium cœlomique, la progression et le maintien de la crête génitale ainsi que le développement gonadique (Figure 4) (Tanaka et Nishinakamura, 2014 ; Mamsen *et al.*, 2017).

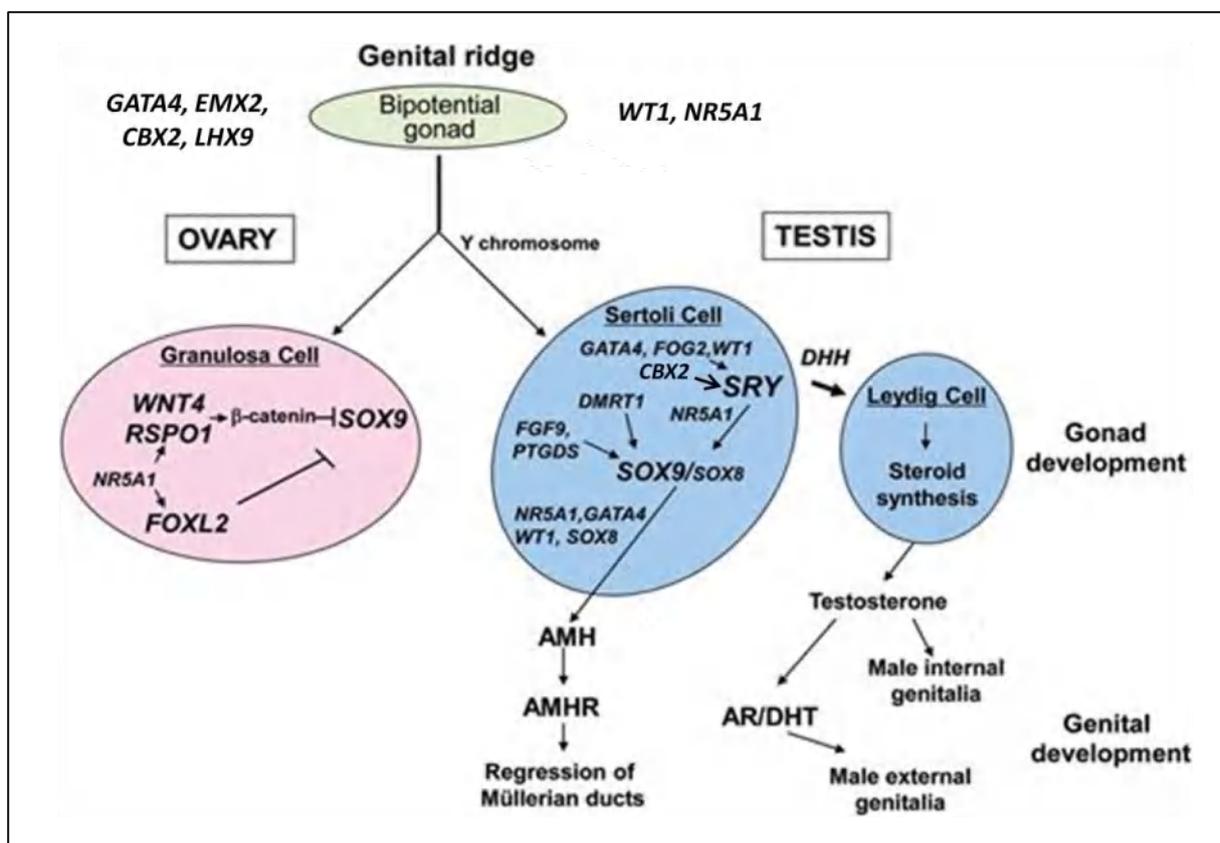


Figure 4. Résumé des principaux évènements moléculaires dans la détermination/différenciation gonadique chez les mammifères (Ahmed *et al.*, 2013, modifié)

1. Gonade bipotentielle

Un des systèmes de communication intercellulaire impliqué dans le développement de la gonade indifférenciée, mis en évidence chez la souris, est la cascade d'expression génique : *CBX2* (*chromobox homologue 2*), *EMX2* (*empty spiracles homeobox 2*), *GATA4*

(*GATA binding protein 4*), *NR5A1* (*nuclear receptor subfamily 5 group A member 1*), *LHX9* (*LIM homeobox 9*) et *WT1* (*Wilms tumor 1*) (Ahmed *et al.*, 2013 ; Mamsen *et al.*, 2017).

1.1 *GATA binding protein 4 (GATA4)*

Le gène *GATA4*, localisé sur le chromosome 8 (8p23.1), code pour un facteur de transcription conservé au cours de l'évolution, caractérisé par la présence de 2 domaines à doigt de zinc (ZNI et ZNII) et participe à la détermination, la prolifération et la maturation cellulaire (Morrisey *et al.*, 1997 ; Viger *et al.*, 1998 ; Eggers et Sinclair, 2012).

La protéine *GATA4* reconnaît le motif *GATA* présent dans la région promotrice de nombreux gènes tels que *NR5A1*, *WT1* et *ZFPM2* (*zinc finger protein, FOG family member 2*), pour réguler l'expression des gènes déterminant le sexe tels que *SRY* et *SOX9*. Chez les embryons de souris, le gène *Gata4* s'exprime très précocement au niveau des cellules de soutien de la gonade bipotentielle par rapport aux gènes *Nr5a1*, *Wt1*, *Lhx9* et *Emx2* (Viger *et al.*, 1998 ; Eggers et Sinclair, 2012 ; Yang *et al.*, 2018).

Chez l'homme, les variants du gène *GATA4* ont été déterminés pour la première fois chez des patients présentant des malformations cardiaques congénitales sans anomalies génitales. Cependant, des anomalies du développement sexuel, telles que l'hypospadias et la cryptorchidie, ont été décrites chez les patients 46,XY avec une délétion de la région 8p23.1 (Garg *et al.*, 2003 ; Martinez de LaPiscina *et al.*, 2018).

1.2 *LIM homeobox 9 (LHX9)*

Le gène *LHX9*, situé sur le chromosome 1 (1q31.3), code pour un facteur de transcription contenant deux domaines fonctionnels: un domaine de liaison à l'ADN et un domaine impliqué dans les interactions protéiques. Chez les souris dépourvues du gène *Lhx9*, la migration des cellules germinales est normale au cours du développement embryonnaire mais les cellules somatiques de la crête génitale ne prolifèrent pas et les gonades ne se forment pas. De ce fait, les souris XY développent un phénotype femelle avec une expression réduite de *Nr5a1*. En outre, des études *in vitro* ont démontré que la protéine *LHX9* est capable de se lier directement au promoteur de *NR5A1* pour permettre son activation en présence ou non de *WT1*, cela suggère donc que l'action de *LHX9* serait en amont de celle de *NR5A1* (Birk *et al.*, 2000 ; Eggers et Sinclair, 2012 ; Domenice *et al.*, 2017).

Récemment, des variants hétérozygotes de *LHX9* ont été signalés chez des patients DSD 46,XY, présentant des degrés variables de sous-virilisation des OGE ou un phénotype féminin normal, une agénésie gonadique et des malformations somatiques (Wang *et al.*, 2018 ; Kunitomo *et al.*, 2020).

1.3 *Wilm's tumor 1 (WT1)*

Le gène *WT1*, situé sur le chromosome 11 (11p13), code pour un facteur de transcription à doigt de zinc, qui, dès la 6^{ème} semaine de développement embryonnaire et selon le contexte cellulaire ou chromosomique, agit comme répresseur ou activateur de nombreux gènes impliqués dans le développement rénal et gonadique (Nordenskjold *et al.*, 1995 ; Hohenstein et Hastie, 2006).

Deux protéines isoformes principales de *WT1* sont importantes dans le développement gonadique et sont définies « +KTS » et « -KTS » respectivement, en fonction de la présence ou l'absence de trois acides aminés, lysine, thréonine et sérine (KTS ; lysine, threonine, serine) entre le 3^{ème} et 4^{ème} doigts de zinc (Pérez de Nanclares *et al.*, 2002).

La forme *WT1* (-KTS) se liant à l'ADN, agit en coopération avec NR5A1 pour assurer la formation correcte du système urogénital. Cette isoforme régule également les gènes *SRY* (*sex-determining region of Y chromosome*), *AMH*, *SOX9* (*SRY-box transcription factor 9*), *WNT4* (*wnt family member 4*) et *NR0B1* (*nuclear receptor subfamily 0 group B member 1*) décrits ci-après. En revanche, l'isoforme *WT1* (+KTS), est impliquée dans le développement précoce du testicule (Biason-Lauber, 2010 ; Ohnesorg *et al.*, 2014).

Les souris dépourvues du gène *Wtl* chez les deux sexes, ne parviennent pas à développer les gonades et les reins, cela suggère le rôle précoce de ce gène dans la formation de la gonade bipotentielle (Kreidberg *et al.*, 1993 ; Hatano *et al.*, 1996).

Chez l'être humain, les variants du gène *WT1* ont été classiquement associés aux anomalies du développement gonadique chez des patients 46,XX ainsi que chez les patients 46,XY présentant la tumeur de Wilms (OMIM 194070), le syndrome de Denys-Drash (OMIM 194080) et le syndrome de Frasier (OMIM 136680) (Ohnesorg *et al.*, 2014 ; Domenice *et al.*, 2017 ; Gomes *et al.*, 2019).

1.4 Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1 (NR5A1)

Le gène *NR5A1* est localisé sur le chromosome 9 (9q33.3), code pour le facteur de transcription SF1 (*steroidogenic factor 1*), membre de la famille des récepteurs nucléaires orphelins, hautement conservé chez les vertébrés. La protéine NR5A1 comprend un domaine de liaison à l'ADN avec deux doigts de zinc, une boîte A servant de médiateur pour la liaison spécifique à l'ADN, une région charnière flexible, un domaine ligand et deux domaines de fonction d'activation (AF-1/2) (Morohashi *et al.*, 1992 ; Luo *et al.*, 1994 ; Val et Swain, 2010).

L'expression du gène *NR5A1* au niveau de la gonade bi-potentielle débute très tôt chez les mammifères, et dès la 6^{ème} semaine chez l'humain, au niveau de l'épithélium cœlomique et des cellules de soutien somatiques. En outre, la protéine NR5A1 joue un rôle central dans la régulation du développement des gonades décrit ci-après (Luo *et al.*, 1994 ; Arango *et al.*, 1999 ; de Santa Barbara *et al.*, 2001).

1.5 Chromobox homologue 2 (CBX2)

Le gène *CBX2*, situé sur le chromosome 17 (17q25.3), code pour une protéine appartenant au complexe multiprotéique Polycomb (PcG) impliqué dans la régulation épigénétique par la reconnaissance des histones méthylées (Katoh-Fukui *et al.*, 1998).

Un *knock out* du gène *Cbx2* est délétère chez des souris mâles XY de phénotype féminin. En revanche, chez les souris XX dépourvues de ce gène, les ovaires sont de petite taille et/ou absents avec des dommages structurels des ovocytes. Des expériences plus poussées ont démontré que les souris *Cbx2*^{-/-} présentent des niveaux d'expression de *Sfl* diminués, ce qui suggère que *Cbx2* joue un rôle dans le développement des crêtes génitales en régulant directement l'expression du gène *Sfl*. Le gène *Cbx2* est également impliqué dans la stabilisation de l'action du gène *Sry* chez les souris XY et le maintien des ovaires chez les souris XX (Katoh-Fukui *et al.*, 2005 ; Katoh-Fukui *et al.*, 2012 ; Garcia-Moreno *et al.*, 2019).

Chez l'humain, il existe 2 isoformes de la protéine CBX2 : une isoforme de 532 acides aminés appelée CBX2.1 et une seconde isoforme plus courte de 211 acides aminés appelée CBX2.2. Des variants bialléliques de perte de fonction du gène *CBX2* ont été décrits chez une fille 46,XY avec un phénotype féminin normale comprenant un utérus et des ovaires

histologiquement normaux. et un tissu ovarien (Katoh-Fukui *et al.*, 1998 ; Biason-Lauber *et al.*, 2009).

1.6 *Empty spiracles homeobox 2 (EMX2)*

Le gène *EMX2*, localisé sur le chromosome 10 (10q26.11) et codant pour un facteur de transcription à domaine de liaison à l'ADN « homeobox », est exprimé au niveau du système urogénital, dans les crêtes urogénitales, les tubules mésonéphrotiques, l'épithélium cœlomique et le mésenchyme, ainsi que dans toutes les cellules somatiques des gonades des deux sexes. Chez la souris, l'inactivation du gène *Emx2* est létale à la naissance avec une absence totale des reins, des uretères, des gonades et des tractus génitaux chez les deux sexes. En revanche, le développement de la vessie et des glandes surrénales est conservé (Miyamoto *et al.*, 1997 ; Kusaka *et al.*, 2010).

Chez l'homme, des variants pathogènes du gène *EMX2* ont été déterminés chez des patients atteints de schizencéphalie, une pathologie neurologique cérébrale très rare dans laquelle une personne est née avec des anomalies des fentes cérébrales, mais aucun phénotype gonadique n'a été décrit (Domenice *et al.*, 2017).

2. Détermination testiculaire

Le premier stade de la différenciation des gonades bi-potentielles en testicules est la différenciation des cellules de soutien en cellules pré-sertoliennes puis en cellules de Sertoli en présence du gène *SRY*, dont l'expression est le premier signe de l'orientation de la gonade indifférenciée vers une gonade masculine (Schmahl *et al.*, 2000 ; Hossain et Saunders, 2001).

2.1 Facteurs de transcription SOX (*SRY-related high-mobility group (HMG) box*)

Les facteurs de transcription SOX, régulés par de multiples voies de signalisation au cours du développement, sont caractérisés par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN de type boîte HMG (*high-mobility group*) de 79 acides aminés, conservé au cours de l'évolution, qui se lie à un site consensus commun avec une efficacité d'expression génique variable (She et Yang, 2015).

2.1.1 *Sex-determining region of Y chromosome (SRY)*

Le gène *SRY*, à un seul exon, est localisé sur le bras court du chromosome Y (Yp11.2), proche de la région pseudo-autosomale, et code pour le facteur déterminant les testicules qui orchestre la morphogenèse de la gonade mâle en agissant comme un facteur de transcription architectural influençant l'expression de ses gènes cibles en induisant des changements de conformation dans la chromatine (Sinclair *et al.*, 1990 ; Ohnesorg *et al.*, 2014).

Après la formation de la gonade bipotentielle chez les individus 46,XY, l'expression du gène *SRY* est régulé transcriptionnellement par NR5A1, WT1, GATA4 et son cofacteur ZFPM2, et CBX2, qui déclenche le processus de la masculinisation gonadique (Hossain et Saunders, 2001 ; Tevosian *et al.*, 2002 ; Katoh-Fukui *et al.*, 2012 ; Bashamboo *et al.*, 2017).

En effet, chez l'embryon mâle des mammifères, le premier signal moléculaire de la détermination sexuelle est l'expression de *Sry* au sein d'une sous-population de cellules somatiques de la crête génitale indifférente. Cette expression initie par la suite la cascade d'interactions géniques et d'événements cellulaires conduisant à la formation d'un testicule après la prolifération des cellules pré-sertoliennes qui se polarisent et s'agrègent autour des cellules germinales pour définir les cordons testiculaires. En revanche, chez l'homme, *SRY* est exprimé dans les cellules de Sertoli et les cellules germinales à partir du moment de la détermination des testicules jusqu'à l'âge adulte (Clépet *et al.*, 1993 ; Bouty *et al.*, 2015 ; Domenice *et al.*, 2017 ; Portnoi *et al.*, 2018).

Chez environ 80% des individus atteints de DSD testiculaire 46,XX (chapitre 3), un matériel *SRY* transloqué dans l'un de leurs chromosomes X a été mis en évidence et près de 20% des individus 46,XY présentant des anomalies du développement gonadique portent un variant de perte de fonction dans le gène *SRY*, cela confirme que le gène *SRY* est nécessaire pour la formation des testicules et la détermination du sexe des gonades mâles (Sinclair *et al.*, 1990 ; Ohnesorg *et al.*, 2014).

2.1.2 *SRY-related HMG box 9 (SOX9)*

Le gène *SOX9*, situé sur le chromosome 17 (17q24.3) et la cible principale de *SRY*, joue un rôle essentiel dans la différenciation cellulaire notamment des cellules mésenchymateuses vers la lignée chondrogénique *via* la modulation transcriptionnelle de *Col2a1* (*collagen type II*

alpha 1 chain), la principale protéine matricielle du cartilage mature, ainsi que dans l'établissement de l'identité des cellules de Sertoli dans le testicule en développement (Foster *et al.*, 1994 ; Wright *et al.*, 1995).

Dans les crêtes génitales des souris XX et XY, le gène *Sox9* est légèrement exprimé, dont la hausse de sa transcription n'est régulée que dans les cellules pré-sertoliennes par la fixation de SRY et SF1 à la fois sur une région *enhancer* spécifique de 1,4 kb, correspondant à la région TESCO (*testis-specific core element*) située à environ 13 kb en amont de *Sox9* (Sekido et Lovell-Badge, 2008 ; Georg *et al.*, 2010 ; Ohnesorg *et al.*, 2014).

Une fois que le niveau d'expression de *Sox9* est suffisant, plusieurs boucles de régulation sont recrutées pour son maintien, y compris l'autorégulation de sa propre expression par l'intermédiaire de TESCO et la formation de boucles de régulation *via* FGF9 (*fibroblast growth factor 9*) et PGD2 (*prostaglandin D2*) qui contribuent à l'amplification de l'expression de *Sox9* et la différenciation de la lignée cellulaire en un nombre suffisant de cellules de Sertoli (Kim *et al.*, 2007 ; Wilhelm *et al.*, 2007 ; Moniot *et al.*, 2009).

Une autre cible directe de SOX9 est le gène *Amh*, qui, en association avec NR5A1 se fixe sur un *enhancer* proche du promoteur d'*Amh* pour l'activer et produire une quantité suffisante d'AMH pour la régression des canaux de Müller (de Santa Barbara *et al.*, 1998 ; Arango *et al.*, 1999).

En l'absence de *Sry* dans une gonade XX, l'expression de *Sox9* est réprimée par l'action de plusieurs gènes déterminant l'ovaire et/ou anti-testiculaire, y compris des composants de la voie de signalisation WNT (décrite ultérieurement), favorisant ainsi le développement de l'ovaire (Wilhelm *et al.*, 2007 ; Jakob et Lovell-Badge, 2011).

De nombreux variants ont été rapportés dans le gène *SOX9* en association avec le syndrome de dysplasie campomélique (OMIM 114290), une malformation congénitale rare du squelette, caractérisée par des anomalies des côtes et du rachis, une courbure des os longs et une petite taille. Environ 75% des individus 46,XY atteints de ce syndrome présentent un phénotype féminin ou avec des organes génitaux ambigus. En outre, des réarrangements génomiques en amont de la région régulatrice du gène *SOX9* ont été identifiés dans un large spectre de DSD, y compris les DSD 46,XX (Foster *et al.*, 1994 ; Benko *et al.*, 2011 ; Bashamboo et McElreavey, 2013)

2.1.3 Autres gènes SOX

Outre *SRY* et *SOX9*, trois autres membres de la famille SOX sont exprimés dans les cellules de Sertoli peu de temps après l'activation de *SOX9*. De manière intéressante, le gène *SOX8* (*SRY-box transcription factor 8*), localisé sur le chromosome 16 (16p13.3), a le même profil d'expression que *SOX9* lors du développement des gonades. L'inactivation de *Sox8* chez les souris mâles a engendré des cellules de Sertoli anormales et une infertilité, mais des structures internes mâles normales. En revanche, les souris double *knock-out Sox8* et *Sox9* n'ont pas développé les cordons testiculaires, ce qui soutient la redondance fonctionnelle entre ces deux protéines après l'activation de *Sox9* au cours du développement et le maintien de cellules de Sertoli. Des réarrangements impliquant le locus *SOX8* et un variant faux-sens ont été associés à un spectre de phénotypes comprenant les DSD 46,XY, l'infertilité masculine et l'insuffisance ovarienne prématurée (O'Bryan *et al.*, 2008 ; Eggers et Sinclair, 2012 ; Eggers *et al.*, 2014 ; Portnoi *et al.*, 2018).

Par ailleurs, le gène *SOX10* (*SRY-box transcription factor 10*), situé sur le chromosome 22 (22q13.1) et dont le profil d'expression est comparable à celui de *SOX9* et *SOX8*, est initialement exprimé dans la gonade indifférenciée chez les deux sexes puis, lors du développement testiculaire. En pathologie humaine, des duplications du chromosome 22 contenant *SOX10* ont été rapportées chez des individus DSD testiculaire 46,XX (Cory *et al.*, 2007 ; Polanco *et al.*, 2010 ; Lavery *et al.*, 2012).

SOX3 (*SRY-box transcription factor 3*), quant à lui, est un gène à un seul exon situé sur le chromosome X (Xq27.1), exprimé dans le cerveau et les gonades. Les souris XX dépourvues de ce gène sont capables de développer des ovaires non fonctionnels tandis que les souris XY ont développé des testicules avec une perte de cellules germinales et une perturbation des tubules séminifères. De ce fait, *Sox3* est important pour la différenciation testiculaire et la gamétogenèse. Chez l'homme, des variants du gène *SOX3* ont été identifiés dans un retard mental lié au chromosome X (OMIM 309530) et chez un patient atteint de DSD ovotesticulaire 46,XX (Weiss *et al.*, 2003 ; Grinspon *et al.*, 2016).

2.2 NR5A1

Bien qu'il soit exprimé pendant la formation de la gonade bipotentielle, le gène *NR5A1* joue un rôle central dans la régulation du développement des glandes surrénales, la différenciation des gonades et dans l'axe hypothalamo-hypophysaire. Chez la souris, *Nr5a1* est transcrit

dans les crêtes génitales et ensuite, dans les lignées de Sertoli et Leydig, ainsi que dans la glande surrénale. Les souris *knock-out* pour ce gène présentent une agénésie gonadique et une absence de glandes surrénales et se développent phénotypiquement comme des femelles mais décèdent peu après la naissance en raison d'une insuffisance surrénale (Luo *et al.*, 1994 ; Ahmed *et al.*, 2013 ; Baetens *et al.*, 2019).

L'expression du gène *NR5A1* régule à la hausse un certain nombre de gènes déterminant le testicule, tels que *SOX9* dans les cellules somatiques du testicule précoce, *AMH* dans les cellules de Sertoli, et les enzymes du système stéroïdogénique dans les cellules de Leydig. Alors que l'expression de *Nr5a1* se poursuit pendant le développement testiculaire chez la souris, elle est régulée à la baisse pendant le développement ovarien. Cependant, *NR5A1* a été détectée dans les cellules de la granulosa et de la thèque d'un ovaire adulte humain, mais son rôle n'est pas clair. Il a été suggéré que *NR5A1* pourrait favoriser l'expression de *FOXL2* (*forkhead box L2*), réprimant finalement *SOX9* et activant les voies antagonistes qui entrent en compétition pour gérer la différenciation des cellules ovariennes (Biaison-Lauber, 2010 ; Baetens *et al.*, 2019).

Les variants de *NR5A1* chez l'humain présentent une pénétrance incomplète et sont associés à un large spectre d'anomalies notamment la dysgénésie gonadique chez les individus 46,XY avec ou sans insuffisance surrénale, des organes génitaux ambigus, un hypospadias, un micropénis, une insuffisance spermatogène avec des organes génitaux normaux, des anomalies du développement gonadique chez les individus 46,XX ou une insuffisance ovarienne primaire (Camats *et al.*, 2012 ; El-Khairi et Achermann, 2012 ; Eggers *et al.*, 2016).

2.3 Doublesex and mab-3-related transcription factor 1 (DMRT1)

Le gène *DMRT1* situé sur le chromosome 9 (9p24.3) code pour un facteur de transcription doté d'un domaine de liaison à l'ADN similaire à un doigt de zinc, appelé le domaine DM (DNA-binding motif) (Raymond *et al.*, 2000 ; Matson *et al.*, 2011).

Chez la souris, *Dmrt1* est exprimé dans les crêtes génitales des deux sexes. Son expression n'augmente et ne se maintient que dans les cellules germinales de Sertoli et pré-méiotiques jusqu'à l'âge adulte, alors que son expression diminue dans l'ovaire. La perte du gène *Dmrt1* chez la souris induit l'activation du gène *Foxl2* (décrit ci-dessous) et la transformation des cellules de Sertoli en cellules de la granulosa (Matson *et al.*, 2011 ; She et Yang, 2014).

Le rôle de *DMRT1* dans la détermination du sexe masculin humain a été confirmé lorsque des délétions de 9p terminal ont été décrites dans le syndrome de monosomie 9p, se caractérisant par une déficience intellectuelle associée à une série d'anomalies somatiques et des troubles du développement testiculaire chez environ 70% des individus 46,XY, allant d'un phénotype complètement féminin à un phénotype masculin avec hypospadias et/ou cryptorchidie (Ottolenghi et McElreavey, 2000).

3. Détermination ovarienne

En l'absence du gène *SRY*, chez les souris XX, la gonade indifférenciée active une voie de signalisation responsable de la régulation du développement ovarien, il s'agit de l'expression du gène *Foxl2* et de la voie de signalisation Rspo1/Wnt4/ β -caténine (Schlessinger *et al.*, 2010 ; Ohnesorg *et al.*, 2014).

3.1 *FOXL2*

Le gène *FOXL2* chez l'humain, situé sur le chromosome 3 (3q22.3), code pour un facteur de transcription appartenant à une famille de protéines conservées et caractérisées par leur domaine de liaison à l'ADN *forkhead*. L'expression de ce gène commence très tôt lors du développement ovarien, dès la 8^{ème} - 9^{ème} semaine de développement et croît par la suite vers la 14^{ème} - 15^{ème} semaine (Carlsson et Mahlapuu, 2002 ; Duffin *et al.*, 2009).

Dans la gonade de la souris XX en développement, *Foxl2* est l'un des premiers gènes à être régulé à la hausse. Ce gène régule négativement l'expression de *Nr5a1* en s'opposant à *Wtl* (-KTS). La suppression de son expression est responsable de l'absence la folliculogénèse et de l'infertilité, sans anomalie de différenciation sexuelle (Ottolenghi *et al.*, 2005 ; Takasawa *et al.*, 2014).

Chez l'humain, la protéine FOXL2 est exprimée dans le mésenchyme des paupières, les cellules de la granulosa fœtales et adultes de l'ovaire, dans l'hypophyse en développement et les cellules gonadotropes et thyrotropes adultes. Des mutations hétérozygotes de *FOXL2* sont responsables du syndrome de *blépharophimosis ptôsis épicanthus inversus* (SBPE) (OMIM 110100), une condition dominante caractérisée par des malformations palpébrales associées à une insuffisance ovarienne prématurée (Crisponi *et al.*, 2001).

3.2 Voie de signalisation canonique Rspo1/Wnt4/ β -caténine

La voie de signalisation WNT/ β -caténine (*Wingless-type MMTV integration site family member/ β -caténine*), joue un rôle important dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaires au cours du développement de la gonade bipotentielle ainsi que dans le développement de l'ovaire (Figure 5) (Niehrs *et al.*, 2012).

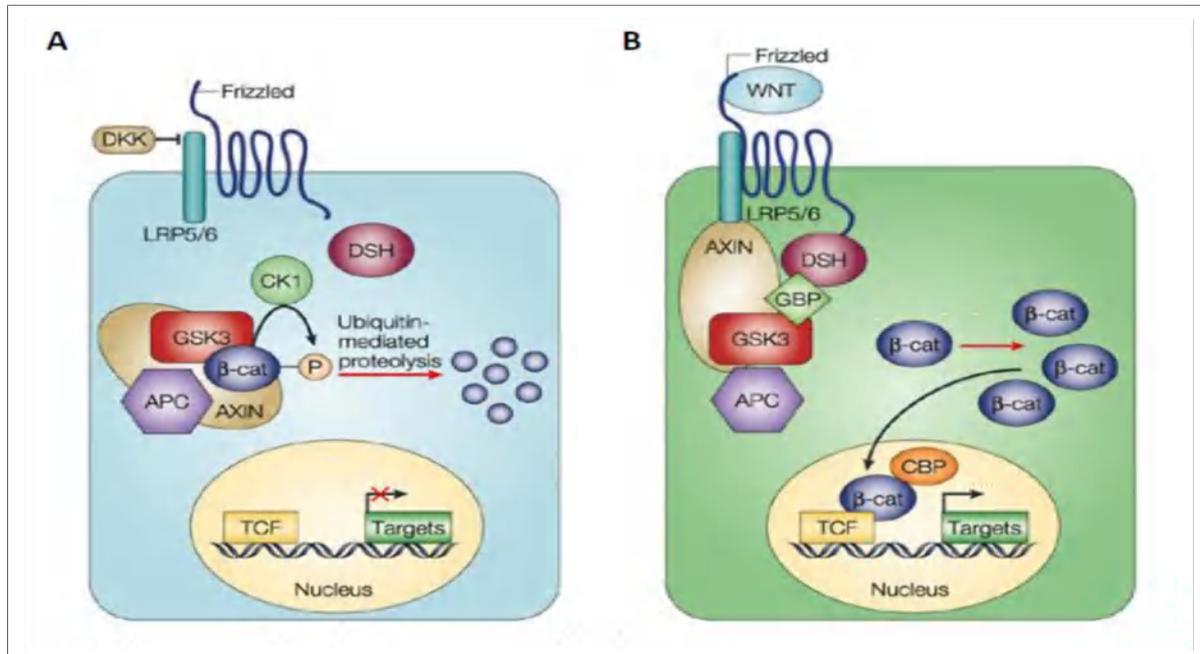


Figure 5. Voie de signalisation WNT/ β -caténine canonique (Moon *et al.*, 2004)

(A) En l'absence de WNT, la β -caténine est séquestrée dans le cytoplasme par un complexe protéique composé de GSK3, AXIN et APC. GSK3 induit la phosphorylation de la β -caténine qui est ubiquitinylée puis dégradée par la voie du protéasome

(B) La fixation du ligand sur son récepteur Frizzled et ses co-récepteurs LRP5/6 active DSH qui bloque GSK3. La β -caténine est libérée du complexe et s'accumule dans le cytoplasme. Elle est ensuite transloquée au noyau où elle active l'expression de ses gènes cibles en partenariat avec les facteurs LEF/TCF.

APC adenomatous polyposis coli, **β -cat** β -catenin, **CBP** CREB-binding protein, **CK** casein kinase, **DKK** Dickkopf, **DSH** Dishevelled, **GBP** GSK3-binding protein, **GSK** glycogen synthase kinase, **LRP** LDL-receptor-related protein, **P** phosphorylation, **sFRP** secreted Frizzled-related protein, **TCF** T-cell factor

Le rôle de la protéine β -caténine, codée par le gène *CTNNB1* (*catenin beta 1*) situé sur le chromosome 3 (3p22.1), dans le développement des gonades humaines n'a pas encore été établi. Cependant, les 2 molécules de signalisation qui l'activent, sont régulées positivement dans la gonade féminine. Il s'agit de la glycoprotéine WNT4, codée par le gène *WNT4* et la protéine RSPO1 (*R-spondin 1*), codée par le gène *RSPO1* situés sur le chromosome 1 (1p36.12 et 1p34.3, respectivement) (Chassot *et al.*, 2012 ; Niehrs *et al.*, 2012 ; Ohnesorg *et al.*, 2014).

Chez les individus XX, l'activation de la voie de signalisation de la β -caténine par ces 2 protéines est nécessaire à la différenciation des cellules de la granulosa conduisant au développement de l'ovaire. La stabilisation de la β -caténine par la voie RSPO1/WNT4 entraîne la transcription de ses gènes cibles. Cependant, le mécanisme par lequel RSPO1 stimule WNT4 dans l'ovaire en développement est inconnu. En général, les RSPO stimulent la signalisation WNT en se liant aux récepteurs couplés aux protéines G riches en leucine, et à 2 régulateurs de rétroaction négative de la voie de signalisation WNT, les ubiquitine-ligases ZNRF3 (*zinc and ring finger 3*) ou RNF43 (*ring finger protein 43*), entraînant ainsi une amélioration de la signalisation WNT (Wang *et al.*, 2013 ; Jiang *et al.*, 2015).

Chez les souris XX, l'absence de *Wnt4* a entraîné une masculinisation partielle de la gonade incluant la différenciation de quelques cellules de Leydig. Par ailleurs, d'autres études ont révélé chez des souris *knock-out* pour le gène *Rspo1* une formation du vaisseau cœlomique (future artère testiculaire), la présence de cellules stéroïdogéniques fonctionnelles responsable de la persistance des canaux de Wolff, la présence de tubules séminifères dépourvus de cellules germinales et la présence de cellules de Sertoli et de Leydig à la fois (Biason-Lauber, 2012; Chassot *et al.*, 2012 ; Chassot *et al.*, 2014).

Chez l'homme, des variants faux-sens hétérozygotes dominantes du gène *WNT4* ont été rapportés chez des individus 46,XX avec divers degrés de virilisation, y compris un excès d'androgènes et un développement anormal des canaux de Müller. En outre, un variant homozygote du gène *WNT4* a été décrit dans une famille consanguine avec un syndrome léthal embryonnaire de DSD testiculaire 46,XX et une dysgénésie des reins, des surrénales et des poumons (Syndrome SERKAL ; OMIM 611812) (Biason-Lauber *et al.*, 2004 ; Mandel *et al.*, 2008 ; Philibert *et al.*, 2011).

Les variants humains homozygotes du *RSPO1* sont associés à un syndrome récessif rare chez les individus 46,XX présentant des anomalies du développement gonadique, une hyperkératose palmoplantaire et une prédisposition au carcinome épidermoïde de la peau (OMIM 610644) (Parma *et al.*, 2006 ; Bashamboo et McElreavey, 2016).

Chapitre III

Anomalies du

développement sexuel

Les anomalies de la détermination/différenciation sexuelle constituent un groupe hétérogène d'affections congénitales dans lesquelles le sexe chromosomique, gonadique ou anatomique est atypique. Le spectre phénotypique s'étend des anomalies mineures, telles que l'hypospadias, aux organes génitaux ambigus et à la dysgénésie gonadique complète, qui sont parfois associées à des syndromes ou à des malformations congénitales multiples (Hughes *et al.*, 2006 ; Hutson *et al.*, 2014 ; Ostrer, 2014).

Les progrès de la compréhension de ce spectre phénotypique ont conduit à une réexamination de la nomenclature « hermaphrodisme, pseudohermaphrodisme et ambiguïté sexuelle » en une nouvelle classification de « DSD » en 2006 (Tableau 1) (Hughes *et al.*, 2006).

Tableau 1. Classification des DSD selon le consensus de Chicago (Hughes *et al.*, 2006)

Ancienne nomenclature	Nomenclature actuelle
Intersexualité	DSD
Pseudohermaphrodisme masculin (masculinisation incomplète des sujets XY)	DSD 46,XY
Pseudohermaphrodisme féminin (virilisation des sujets XY)	DSD 46,XX
Hermaphrodisme vrai	DSD ovotesticulaire
Mâle XX ou réversion sexuelle XX	DSD testiculaire 46,XX
Réversion sexuelle XY	Dysgénésie gonadique complète 46,XY

Ces anomalies surviennent au cours du développement embryonnaire et fœtal et peuvent être dues à des variants de gènes impliqués dans le développement gonadique et/ou génital, des variations numériques ou structurelles des chromosomes sexuels, des troubles de la stéroïdogénèse gonadique et/ou surrénale, des facteurs maternels (endogènes ou exogènes) ou des changements épigénétiques perturbant l'expression génique. Au cours de ces dernières années, de nombreuses causes ont été génétiquement déterminées et analysées lors d'un établissement d'un diagnostic moléculaire pour les DSD (Annexe 1) (Croft *et al.*, 2016 ; Audi *et al.*, 2018).

1. DSD 46,XY

1.1 Anomalies du développement testiculaire

Les anomalies du développement testiculaire englobe plusieurs conditions cliniques causées par le développement irrégulier de la gonade fœtale 46,XY.

1.1.1 Dysgénésie gonadique complète (DGC) et partielle (DGP)

La DGC chez les individus 46,XY se caractérise par des OGE féminins (rarement avec une clitoromégalie) et une absence de caractères sexuels secondaires masculins. Les testicules sont absents et sont remplacés par des bandelettes fibreuses ou des gonades dysgéniques incapables de produire la testostérone et l'AMH, engendrant ainsi, une absence du développement des structures internes masculines et une persistance de canaux müllériens qui se développent en un utérus et des trompes de Fallope hypoplasiques ou normales. Les patientes avec une DGC 46,XY sont élevées comme des filles et sont généralement diagnostiquées à la puberté en raison d'infantilisme et d'aménorrhée primaire, et ce n'est qu'au cours du diagnostic clinique que le caryotype réalisé montre une formule 46,XY (Hughes *et al.*, 2006 ; Mendonca *et al.*, 2009 ; Rocha *et al.*, 2011).

En revanche, la DGP est définie par des degrés distincts du développement et de la fonction testiculaires. En période néonatale, les patients atteints de DGP 46,XY présentent des OGE atypiques variant d'un enfant à l'autre en fonction de la quantité de testostérone produite au moment de la différenciation sexuelle, ainsi que la présence ou l'absence de canaux müllériens en fonction de la sécrétion d'AMH par les cellules de Sertoli (Hughes *et al.*, 2006 ; Mendonca *et al.*, 2009).

La DGP a initialement été considérée comme une variante de la DGC 46,XY. Cependant, les variants du gène *SRY* décrits dans de nombreux cas de DGC sont rarement observés dans la DGP. En outre, des variants hétérozygotes et homozygotes du gène *NR5A1* ont été déterminés chez environ 15% des patients atteints de DGP (Hawkins *et al.*, 1992 ; Uehara *et al.*, 2002 ; Lin et Achermann, 2008 ; Ferraz-de-Souza *et al.*, 2011 ; Rocha *et al.*, 2011).

Alors que le taux d'œstradiol est bas dans les deux formes de dysgénésie gonadique (DG), les taux de gonadotrophines sont élevés, principalement celui de la FSH (*follicle stimulating hormone*). En revanche, dans la forme complète, le taux de la testostérone se situe dans les normes pré-pubères, tandis qu'il varie dans la forme partielle, des normes pré-pubères aux normes adultes normales (Mendonca *et al.*, 2009).

Les DG 46,XY affectent 1 pour 10 000 naissances avec une étiologie génétique très hétérogène pouvant résulter d'un variant dans n'importe quel gène impliqué dans le développement de la gonade bipotentielle ou dans le développement du testicule. Les causes les plus fréquentes de dysgénésie gonadique sont les altérations du gène *SRY* (20%), suivies par les variants du gène *MAP3K1* (18%) et *NR5A1* (13%), d'autres modifications rares du gène *SOX9* ou *NROB1* ont été signalées dans la littérature (Hughes *et al.*, 2006 ; Ahmed *et al.*, 2013 ; Barseghyan *et al.*, 2018).

1.1.2 Régression gonadique

Le syndrome de régression testiculaire (SRT) (OMIM 273250), également connu sous le vocable de "*vanishing testes*", est une affection due à l'atrophie et à la disparition ultérieures d'un testicule initialement normal au cours de la vie fœtale, chez les individus 46,XY. Ces derniers naissent avec des OGE masculins, ce qui indique un fonctionnement correct du tissu testiculaire au début de la vie intra-utérine (Selby, 1992 ; Hegarty *et al.*, 2006 ; Heksch *et al.*, 2019).

Le SRT est considéré comme le résultat d'une thrombose vasculaire prénatale ou d'une torsion testiculaire. Si cela se produit au cours de la deuxième moitié de gestation, la croissance du pénis sera altérée en raison d'une carence en testostérone, entraînant ainsi un micropénis chez 50% des cas. Dans le cas contraire, la longueur du pénis est normale lorsque l'accident a lieu en fin de grossesse ou après la naissance (Bar-Maor *et al.*, 1993 ; Papparella *et al.*, 1999 ; Pirgon et Dündar, 2012).

La coexistence de l'anorchie et de l'ambiguïté génitale dans un certain nombre de cas familiaux a conduit à l'hypothèse que certaines formes de l'affection pourraient avoir une cause génétique et faisant partie du spectre clinique de la dysgénésie gonadique 46,XY. Cependant, les analyses moléculaires ont permis d'identifier quelques gènes associés à l'anorchie, tels que *NR5A1* et *DHX37*. Par ailleurs, une régression testiculaire a été observée en association avec une microdélétion du chromosome Y (Calogero *et al.*, 2001 ; Heksch *et al.*, 2019 ; McElreavey *et al.*, 2020 ; Zidoune *et al.*, 2021)

1.1.3 DSD ovotesticulaire (DSD OT)

Autrefois, appelé « vrai hermaphrodisme », les DSD OT sont définis comme la présence du tissu testiculaire et du tissu ovarien chez un même patient, soit dans la même gonade, soit dans des gonades différentes, soit sous forme d'un ovaire et d'un testicule controlatéral. Ces formes peuvent être associées à un mélange de dérivés müllériens et/ou wolffiens, un utérus normal ou un utérus unicorne (Krob *et al.*, 1994 ; Damiani *et al.*, 1997 ; Knarston *et al.*, 2016).

Dans la petite enfance, les gonades semblent avoir un tissu ovarien avec de nombreux follicules et un tissu testiculaire normal avec des tubules séminifères contenant des cellules germinales. Cependant, avec le temps, le tissu ovarien est souvent normal et fonctionnel chez 50% des cas, alors que le tissu testiculaire régresse, devenant dysgénétique et présentant une fibrose interstitielle avec un manque de spermatogonies (Krob *et al.*, 1994 ; Verkauskas *et al.*, 2007 ; Knarston *et al.*, 2016).

Les nourrissons naissent avec des OGE ambigus avec divers degrés de virilisation et sont généralement assignés comme mâles ou rarement avec des OGE féminins normaux. A la puberté, le développement des glandes mammaires et la ménarche sont possibles en raison de la sécrétion d'œstrogènes par le tissu ovarien (Hadjithanasiou *et al.*, 1994 ; Dutta *et al.*, 2014).

L'incidence des DSD OT est d'environ 1 pour 100 000 naissances dont 65% des cas présentent un caryotype 46,XX et 10% avec un caryotype 46,XY. Les autres cas présentent des mosaïcismes de chromosomes sexuels: 46,XX/46,XY (12,8%) sont les plus fréquents, suivis par 46,XX/47,XXY (5,6%) et 45,X0/46,XY (3,5%) (van Niekerk et Retief, 1981 ; Knarston *et al.*, 2016).

Des variants des gènes *SRY* et *SOX9* ainsi qu'une délétion du gène *DMRT1* ont été signalés dans la littérature comme cause moléculaire de DSD OT 46,XX (Cameron *et al.*, 1996 ; Maier *et al.*, 2003 ; Ledig *et al.*, 2012).

1.2 Anomalies de synthèse/action des androgènes

1.2.1 Anomalies de biosynthèse des androgènes

Au cours des différentes étapes de la vie, du début du développement embryonnaire à l'âge adulte, les stéroïdes sexuels d'origine gonadique et surrénalienne jouent un rôle essentiel dans le développement de sexe. Parmi les enzymes catalysant la biosynthèse de ces hormones sexuelles, certaines sont présentes à la fois dans le cortex surrénalien et les gonades dont les défauts provoquent une hyperplasie congénitale des surrénales (décrite ci-dessous). En revanche, d'autres enzymes existant principalement dans les gonades, et sont responsables de la synthèse des stéroïdes sexuels (testostérone dans les testicules et œstrogènes dans les ovaires) (Figure 6) (Miller et Auchus, 2011 ; Mula-Abed *et al.*, 2014 ; Al-Sinani *et al.*, 2015).

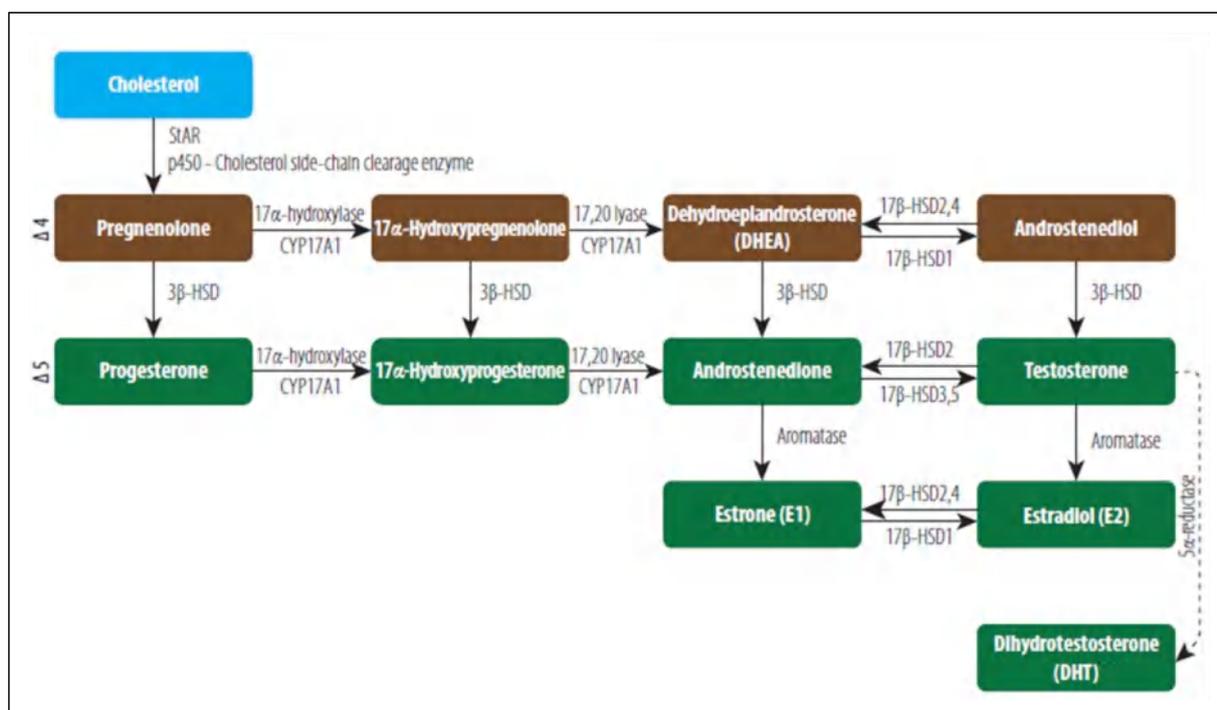


Figure 6. Biosynthèse des hormones stéroïdes dans les gonades (testicules et ovaires)
(Al-Sinani *et al.*, 2015)

StAR: *steroidogenic acute regulatory protein*, **3β-HSD:** *3 hydroxysteroid dehydrogenase*,
Δ^{5,4}: *isomerase 17-hydroxysteroid dehydrogenase*

Les variants géniques ont été signalés dans les gènes *HSD17B3* et *SRD5A2* qui réduisent ou qui bloquent la synthèse de la testostérone et de la DHT. Les enfants 46,XY avec un déficit en 17-β-HSD ou en 5α-réductase, présentent des OGE variables allant du phénotype féminin complet ou ambigu à un phénotype masculin prédominant avec un micropénis, une cryptorchidie et un hypospadias. Les OGI sont également variables et peuvent être

hypoplasiques ou normaux, cela dépend de l'exposition à la testostérone et à la DHT pendant le développement embryonnaire (Castro *et al.*, 2012 ; Marchetti et Barth, 2013 ; Engeli *et al.*, 2017).

1.2.2 Anomalies d'action des androgènes

Le syndrome d'insensibilité aux androgènes (SIA) est un trouble de l'action des androgènes dû à une fonctionnalité réduite ou absente du récepteur des androgènes AR. Il s'agit de la cause monogénique la plus fréquente des DSD 46,XY, dont la fréquence est de 1 pour 20 000- 64 000 naissances chez l'homme. En fonction de l'expression phénotypique qui est due à l'activité transcriptionnelle du gène *AR*, les SIA sont classés en syndrome d'insensibilité aux androgènes complète (SICA) ou partielle (SIPA) (Audi *et al.*, 2010).

Suite à l'absence totale de réponse aux androgènes pendant des phases critiques de la différenciation génitale fœtale, le phénotype du SICA est caractérisé par la présence d'OGE féminins chez les individus 46,XY, des testicules inguinaux ou abdominaux. A la puberté, ces sujets présentent un développement complet des seins, une pilosité axillaire et pubienne faible ou absente et une aménorrhée primaire. Le diagnostic clinique du SICA est facilement confirmé, car environ 85% des cas présentent une altération de la séquence codante du gène *AR* (Damiani *et al.*, 2002 ; Ahmed *et al.*, 2013).

En revanche, le phénotype du SIPA se définit par des OGE masculins avec un hypospadias ou des OGE féminin ambigus et une gynécomastie à la puberté. Le diagnostic clinique chez ces sujets plus ou moins compliqué et n'est noté que chez moins de 30% des cas présentant un variant causal du gène *AR* (Ahmed *et al.*, 2013, Hornig *et al.*, 2016).

1.2.3 Hypoplasie des cellules de Leydig (HCL)

La synthèse d'androgènes est sous le contrôle de l'hCG (*human chorionic gonadotropin*) pendant la vie fœtale et de la LH (*luteinizing hormone*) en période postnatale. Ces deux hormones glycoprotéiques agissent en stimulant le même récepteur transmembranaire LHCGR (*luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor*) codé par le gène *LHCGR*, situé sur le chromosome 2 (2p16.3), et jouant un rôle fondamental dans la physiologie de la reproduction masculine et féminine (Tsai-Morris *et al.*, 1998 ; Ascoli *et al.*, 2002).

Au cours de la différenciation des cellules de Leydig, la sécrétion d'androgènes semble être autonome puis la hCG produite par le placenta stimule fortement la différenciation de ces cellules et la sécrétion d'androgènes jusqu'aux deux derniers trimestres de grossesse. Au stade pubertaire, la LH conduit à la sécrétion des androgènes par l'intermédiaire du LHCGR, induisant ainsi les caractères sexuels secondaires masculins (Saez, 1994 ; Qiao et Han, 2019).

La plupart des causes moléculaires inactivatrices du gène *LHCGR* chez l'homme 46,XY, consiste en des variants faux-sens suivis par des variants non-sens et de la délétion du gène. Ces altérations entraînent l'HCL (OMIM 238320), une catégorie unique des DSD 46,XY résultant de l'incapacité du récepteur LHCGR dans les cellules de Leydig à répondre aux hormones cibles circulantes, provoquant ainsi une féminisation complète ou incomplète du fœtus 46,XY, ou une différenciation sexuelle masculine normale avec un hypospadias et/ou un micropénis. Le diagnostic de l'HCL est généralement établi à la puberté, en raison de l'absence de développement mammaire et/ou d'une aménorrhée primaire (Huhtaniemi et Alevizaki, 2006 ; Qiao et Han, 2019).

1.2.4 Syndrome de persistance des dérivés müllériens 46,XY

Le syndrome de persistance des canaux müllériens (SPCM, OMIM 261550), type rare de pseudohermaphrodisme masculin, est causé par un déficit en AMH ou un défaut de son récepteur *AMHR2* (*anti-mullerian hormone type II receptor*). Les patientes 46,XY SPCM manifestent des canaux müllériens, un utérus et des trompes de Fallope avec des OGE complètement masculins avec un urètre qui s'ouvre généralement à l'extrémité du pénis. Dans la majorité des cas, les deux testicules sont en position intra-abdominal. Cependant, d'autres cas ont été rapportés avec une cryptorchidie unilatérale avec hernie controlatérale ou une ectopie testiculaire transverse (Baarends *et al.*, 1994; di Clemente *et al.*, 1994 ; Picard *et al.*, 2017).

La plupart des cas sont diagnostiqués en raison d'une cryptorchidie bilatérale ou unilatérale avec ou sans hernie inguinale. A l'âge adulte, le diagnostic du SPCM est posé en raison de la dégénérescence testiculaire maligne unilatérale ou bilatérale chez environ 33% des patients de plus de 18 ans. Cependant, les tumeurs des dérivés müllériens sont moins fréquentes et la fertilité est rare mais possible si au moins un testicule est en position scrotal et que ses canaux excréteurs sont intacts (Picard *et al.*, 2017 ; Picard et Josso, 2019).

Les variants homozygotes ou hétérozygotes des gènes *AMH* et *AMHR2* entraînent une déficience ou une résistance de l'AMH, sans aucune différence anatomique entre les patients présentant des variants de la protéine AMH (SPCM de type 1) ou de son récepteur AMHR2 (PMDS de type 2). Toutefois, les taux sériques d'AMH sont faibles ou indétectables, chez les patients présentant des modifications de la séquence de l'AMH, tandis que chez les patients avec des altérations de l'AMHR2, les taux d'AMH sont normaux ou élevés. Le diagnostic moléculaire est confirmé dans la majorité des cas du SPCM. Cependant, une perturbation d'autres voies impliquées dans la régression de Müller reste inconnue (Picard *et al.*, 2017 ; Picard et Josso, 2019).

1.3 Hypospadias

L'hypospadias est l'anomalie congénitale la plus fréquente des OGE chez les garçons, avec une incidence de 1 sur 200-300 naissances. Elle est définie par une localisation atypique (antérieure, médiane ou postérieure) de l'orifice urétrale sur la partie ventrale du pénis, qui se produit suite à une fermeture anormale ou incomplète de l'urètre pendant les premières semaines du développement embryonnaire. Dans la plupart des cas, l'hypospadias apparaît comme une condition isolée, mais il peut être associé à d'autres anomalies de l'appareil urogénital, tels que : une cryptorchidie ou une ectopie testiculaire, un micropénis, une courbure ventrale du pénis et/ou un prépuce anormal (Butwicka *et al.*, 2015 ; Bouty *et al.*, 2015).

Dans la littérature, un certain nombre de gènes a été largement associé à l'hypospadias, cependant, dans 30% des cas seulement, la cause génétique était claire. Par la suite, il a été suggéré que l'étiologie de cette anomalie est une combinaison de facteurs génétiques et d'influences environnementales telle que l'exposition élevée à des composés œstrogéniques et anti-androgéniques, interférant avec la synthèse des androgènes au cours du développement embryonnaire. En effet, la perturbation de diverses voies impliquées dans le développement du tubercule génital, y compris la détermination gonadique, la stéroïdogénèse et plusieurs autres voies de signalisation ont été déterminées chez des patients atteints d'hypospadias, incluant les gènes *WT1*, *MAP3K1*, *MAMLD1* et *NR5A1*, *HSD17B3*, *SRD5A2* et *AR* (Bouty *et al.*, 2015 ; Yuan *et al.*, 2017 ; Vuthy *et al.*, 2021).

1.4 Cryptorchidie

La migration des testicules dans le scrotum est un processus comportant deux phases, l'une précoce dite trans-abdominale se manifestant au cours du 1^{er} trimestre de grossesse, pendant laquelle, l'hormone INSL3 (*insulin like 3*), synthétisée par les cellules de Leydig, stimule le gubernaculum, ou le ligament génito-inguinal, qui s'élargit pour entraîner le testicule vers la partie caudale de l'abdomen. Ensuite, pendant la 2^{ème} phase, inguino-scrotale, ayant lieu en fin de grossesse, le gubernaculum guide la descente des testicules vers le scrotum (Hughes et Acerini, 2008 ; Ayers *et al.*, 2019).

L'absence de la production de testostérone par les cellules de Leydig fœtales ou l'absence des récepteurs d'androgènes fonctionnels stoppent la descente des testicules, engendrant ainsi la cryptorchidie pouvant être unilatérale ou bilatérale, associée ou non à d'autres anomalies. La cryptorchidie est fréquente, elle est signalée chez 9% des garçons nouveau-nés. Les variants du gène *INSL3* et de son gène récepteur *RXFP2* (*relaxin/insulin-like family peptide receptor 2*) ont été rapportés comme étant impliqués dans cette anomalie grâce à des travaux sur des modèles murins (Hughes et Acerini, 2008 ; Vikraman *et al.*, 2016 ; Ayers *et al.*, 2019).

1.5 Troubles syndromiques complexes

Des exemples de formes syndromiques des DSD 46,XY seront décrits ultérieurement dans la partie pratique.

2. DSD 46,XX

2.1 Anomalies du déterminisme ovarien

2.1.1 DSD ovotesticulaire 46,XX (DSD OT 46,XX)

La présence du locus *SRY* chez les patients 46,XX avec un développement testiculaire a longtemps été la seule cause génétique identifiable. Ce n'est qu'après quelques années qu'il a été constaté que le matériel *SRY* transloqué sur le chromosome X n'est présent que chez 10% des cas DSD OT 46,XX. En outre, certains gènes bien connus favorisant le développement des voies ovariennes et testiculaires sont également capables de provoquer un DSD OT 46,XX, par exemple les variants impliquant les gènes *NR5A1*, *WT1*, *WNT4*, *RSPO1* et *SOX3*. De plus, les gains de nombre de copies de la région régulatrice en amont du gène *SOX9*, les réarrangements génomiques du chromosome 22 contenant *SOX10*

et le gain *de novo* dans la région Xq27.1, incluant le gène *SOX3* ont été révélés dans les cas de DSD OT 46,XX (Verkauskas *et al.*, 2007 ; Benko *et al.*, 2011 ; Baetens *et al.*, 2017 ; Bashamboo *et al.*, 2017 ; Grinspon et Rey, 2019).

2.1.2 DSD testiculaire 46,XX (DSD T 46,XX)

Précédemment nommés « mâle XX » ou « réversion sexuelle XX », les DSD T 46,XX affectent 1 pour 20 000-25 000 naissances dont environ 10-15% des cas présentent un hypospadias. Les individus affectés présentent des OGE masculins variant de normaux à ambigus avec une présence des deux testicules et une absence des dérivés müllériens. A l'âge adulte, ces individus ont de testicules hypotrophiques, une gynécomastie et une azoospermie (Lápez *et al.*, 1995 ; Knarston *et al.*, 2016).

Sur le plan moléculaire, la translocation du gène *SRY* sur le chromosome X paternel ou un autosome est suffisante pour entraîner une différenciation masculine et une gynécomastie. Chez 10% des sujets atteints de DSD T 46,XX, le *SRY* est négatif, bien que ces derniers présentent différents degrés de masculinisation. L'étiologie de ces cas est encore largement inconnue malgré que des altérations par gain de fonction ont été mises en évidence dans la région en amont de *SOX9* et sont définies comme étant suffisantes pour initier la différenciation des testicules en l'absence de *SRY*. La surexpression du gène *SOX10* ou la perte de fonction dans des gènes impliqués dans le développement ovarien, tels que les gènes *RSPO1* et *WNT4* mentionnés précédemment, contribue également aux DSD ont été décrites dans la littérature (Abbas *et al.*, 1993 ; Hung et Kempthues, 1999 ; Ergun-Longmire *et al.*, 2005 ; Grinspon et Rey, 2019).

2.1.3 Dysgénésie ovarienne

Les femmes ayant un caryotype 46,XX et une dysgénésie ovarienne naissent avec des OGE complètement féminins sans ambiguïté, mais présentent plus tard une puberté absente ou retardée désignée par une aménorrhée primaire ou secondaire, une absence des caractéristiques secondaires féminines et des gonades striées. De ce fait, les œstrogènes ne sont pas synthétisés et la sécrétion des gonadotrophines n'est pas inhibée par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, ce qui entraîne un taux élevé de gonadotrophines, d'où l'absence de début de puberté et de ménarche (Meyers *et al.*, 1996 ; Migeon et Wisniewski, 2003).

Chez des patientes atteintes de dysgénésie ovarienne, des variants impliquant les gènes des récepteurs des gonadotrophines *FSHR* (*follicle stimulating hormone receptor*) et *LHCGR* (*luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor*) ont été définis comme perturbateurs de la signalisation hormonale et de la folliculogénèse. La dysgénésie gonadique est également associée à des anomalies majeures du chromosome X impliquant plusieurs locis tels que le gène *BMP15* (*bone morphogenetic protein 15*), le gène *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*) dont la fonction est liée au développement ovarien (Aittomäki *et al.*, 1996 ; Marozzi *et al.*, 2000 ; Rossetti *et al.*, 2009).

Parmi les gènes nouvellement identifiés en association avec la dysgénésie ovarienne, le gène *NOBOX* (*newborn ovary homeobox*) situé sur le chromosome 7 (7q35) est exprimé dans les kystes de cellules germinales, les ovocytes primordiaux et en développement dans des modèles de souris et chez l'homme. Ainsi que le gène *FIGLA* (*folliculogenesis specific bHLH transcription factor*) situé sur le chromosome 2 (2p13.3) a un rôle spécifique dans le développement du follicule primordial et dans la synchronisation des gènes dans la zone pellucide (Zhao *et al.*, 2008 ; Ferrari *et al.*, 2016 ; Cattoni *et al.*, 2020).

2.2 Défauts de synthèse des stéroïdes (excès d'androgènes)

2.2.1 Excès d'androgènes fœtaux

La virilisation des OGE chez la plupart des nouveau-nés présentant un caryotype 46,XX est due à une hyperplasie congénitale des surrénales (HCS). Celle-ci englobe un groupe de troubles autosomiques récessifs caractérisés par un déficit de l'une des enzymes impliquées dans la synthèse du cortisol et/ou l'aldostérone : 21-hydroxylase, 11-hydroxylase et 3 β -hydroxystéroïde. Ainsi, un excès d'androgènes provoque une hypertrophie clitoridienne avec une fusion partielle ou complète des grandes lèvres et un vagin court, ou une virilisation des OGE semblant être masculin avec une cryptorchidie bilatérale (Speiser et White, 2003 ; Othman *et al.*, 2014).

La forme la plus courante d'HCS est due à un déficit en 21-hydroxylase, enzyme du cytochrome P450 de type II, essentielle pour la stéroïdogénèse des glandes surrénales. Ce déficit est causé dans 90-95 % des cas d'HCS par des variants du gène *CYP21A2* (*cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2*), situés sur le chromosome 6 (6p21.33) (White *et al.*, 1984 ; Araujo *et al.*, 2007 ; Arlt et Krone, 2007).

2.2.2 Excès d'androgènes fœtoplacentaires

Les stéroïdes synthétisés au cours du développement fœtal sont transférés au placenta et sont transformés en androgènes ; l'enzyme aromatase, codé par le gène *CYP19* (*cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1*) localisé sur le chromosome 15 (15p21.1), catalyse la conversion de ces androgènes en œstrogènes. L'aromatase des androgènes surrénaliens fœtaux est essentielle à la production d'œstrogènes pendant la grossesse par le placenta humain, dont les principaux produits sont l'œstriol, l'œstrone et l'œstradiol. Par conséquent, un défaut d'aromatase du placenta entraîne une faible production d'œstrogènes pendant la grossesse (Payne et Hales, 2004 ; Lin *et al.*, 2007).

En outre, le déficit en aromatase conduit à la virilisation de la mère pendant la grossesse et à l'exposition du fœtus féminin aux androgènes surrénaliens présentant des organes génitaux ambigus, des niveaux d'androgènes élevés et des niveaux d'œstrogènes indétectables à la naissance. À un stade ultérieur, le déficit en aromatase est associé à un manque de développement mammaire, à une aménorrhée primaire et à des ovaires polykystiques, se développant non seulement chez les adolescentes mais aussi pendant la petite enfance et l'enfance (Mullis *et al.*, 1997 ; Belgorosky *et al.*, 2003 ; Lin *et al.*, 2007).

2.2.3 Excès de production d'androgènes chez la mère

Pendant la grossesse, l'origine de l'excès d'androgènes (hyperandrogénie) chez la mère peut être due, soit à une tumeur ovarienne (lutéome), soit au syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), soit à des tumeurs surrénaliennes. Le lutéome est une tumeur bénigne de l'ovaire qui, pendant la grossesse, favorise une masculinisation du fœtus chez environ 65% des mères virilisées et régressent après la grossesse. Le SOPK se caractérise principalement par un excès d'androgènes et des défauts de reproduction associés à des anomalies métaboliques, comme la résistance à l'insuline. En revanche, les carcinomes et adénomes des glandes surrénales maternelles sont très rares et peuvent entraîner une virilisation de la mère, parmi d'autres caractéristiques cliniques telles que l'hypertension artérielle ou le diabète sucré (Kaňová *et al.*, 2011 ; Morris *et al.*, 2011).

Chapitre IV

Traitements et prise en charge des patients DSD

Le diagnostic et le traitement des DSD est un défi crucial pour les cliniciens, nécessitant une prise en charge médicale pluridisciplinaire à long terme, incluant un spécialiste en médecine fœtale, néonatalogue, endocrinologue, chirurgien pédiatre, radiologue, généticien, et pédopsychiatre pour appréhender ces situations rares et souvent complexes. L'amélioration des connaissances étiologiques nécessite des examens cliniques, d'imagerie, biochimiques (hormonaux), génétiques, ainsi que de nouvelles approches chirurgicales, essentiels pour la prise en charge de personnes atteintes de DSD (Gleeson *et al.*, 2013 ; Phan-Hug *et al.*, 2016).

Le traitement des différents cas de DSD doit porter sur l'assignation sexuelle nécessitant une éventuelle prise en charge hormonale substitutive surrénalienne si c'est la fonction des surrénales ou stéroïdienne qui est altérée, chez les nouveaux nés et les enfants. En revanche, si c'est la fonction gonadique qui est altérée, la prise en charge est établie dès l'âge pubertaire. En outre, une intervention chirurgicale des structures génitales et/ou gonadiques (selon le risque de malignité) ainsi que le besoin d'un accompagnement familial et psychosocial et une organisation adéquate du passage vers les spécialités médicales adultes (endocrinologue, psychiatre, psychologue, gynécologue, etc.) présentent un rôle fondamental dans la prise en charge des patients atteints de DSD (Cools et Stenvert, 2006 ; Hemesath *et al.*, 2019 ; Guerrero-Fernández *et al.*, 2018).

1. Traitement hormonal

Dès la période anténatale ou néonatale, l'endocrinologue est impliqué dans l'attribution du sexe d'un nouveau-né avec DSD. Le choix du bon moment pour effectuer des dosages hormonaux est nécessaire pour répondre aux variations du phénotype sexuel liées au développement des gonades, à la synthèse des stéroïdes ou à la sensibilité aux androgènes en raison de la diversité des taux hormonaux durant les premiers mois de vie (Figure 7) (Lee *et al.*, 2006 ; Ogilvy-Stuart et Brain, 2006 ; Wilson *et al.*, 2012).

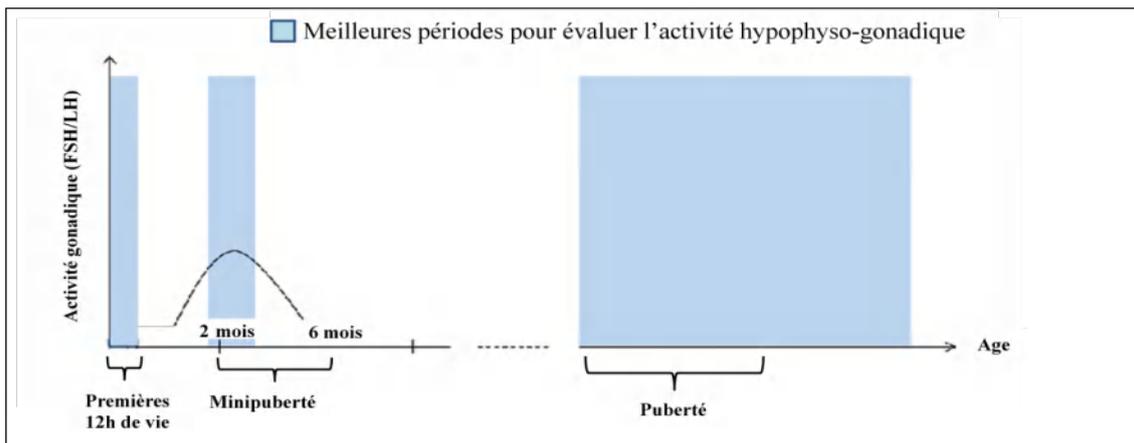


Figure 7. Périodes optimales pour effectuer un dosage hormonal (Phan-Hug *et al.*, 2016)

A la puberté, l'absence des caractères sexuels secondaires chez certains adolescents, peut être le moment de découverte du DSD nécessitant un traitement par des stéroïdes sexuels. L'utilisation précoce de la testostérone permet une meilleure réponse du fait que les récepteurs aux androgènes diminuent à l'adolescence et au début de l'âge adulte. En revanche, les questions concernant la fertilité sont abordées de manière individualisée (Phan-Hug *et al.*, 2016 ; Hemesath *et al.*, 2019).

Certains paramètres endocriniens doivent également être pris en compte pour la détermination du meilleur moment chirurgical décrit ci-après. L'utilisation de la stimulation hormonale préopératoire est indispensable, soit pour établir un diagnostic clinique en testant la sensibilité aux androgènes et en déterminant la fonction gonadotrope, soit pour agrandir de façon temporaire le tubercule génital dans les cas des ou un gland moins de 15 mm en largeur, associé ou non à une forme très sévère d'hypospadias, facilitant ainsi, le geste chirurgical (Hatipoğlu et Kurtoğlu, 2013 ; Xu *et al.*, 2017 ; Hemesath *et al.*, 2019).

Habituellement, ces 3 hormones sont prescrites au moins 3 mois avant la chirurgie car la stimulation entraîne une hypervascularisation (source d'hématome) et retarde la cicatrisation tissulaire (Koff et Jayanthi, 1999 ; Kaya *et al.*, 2008):

- l'hormone hCG (*human chorionic gonadotropin*) recombinée (injectable) est administrée pour la chirurgie de l'hypospadias et notamment lors du diagnostic médical pour l'évaluation de la fonction leydigienne par le changement de l'aspect des OGE et le taux de la testostérone,
- la DHT (voie locale) est indiquée en cas de déficit en 5- α -réductase et est utilisée dans la chirurgie de l'hypospadias,
- la testostérone (injectable) est administrée pour les cas de micropénis et pour les patients ayant subi des interventions chirurgicales répétées.

2. Traitement chirurgical

Le traitement chirurgical des DSD implique fréquemment des modifications irréversibles du phénotype du patient. La décision du choix du sexe d'assignation doit être prise conjointement par la famille et l'équipe multidisciplinaire conseillant la famille, ainsi que le patient, dans la mesure du possible (Karkazis, 2006 ; Guerrero-Fernández *et al.*, 2018).

Différents types d'interventions chirurgicales aussi bien masculinisantes que féminisantes peuvent être effectuées pour le traitement des DSD selon l'âge et le sexe, y compris la vaginoplastie, la chirurgie mammaire, l'excision des reliquats müllériens et l'orchidopexie. La décision d'effectuer ou non une gonadectomie doit être établie au cas par cas en fonction du bilan biologique (fonction gonadique) et anatomopathologique stratifiant le risque de dégénérescence tumorale (van der Zwan *et al.*, 2015 ; Guerrero-Fernández *et al.*, 2018).

3. Prise en charge psychologique

L'assignation sexuelle suivie d'une hormonothérapie et d'une chirurgie ne résout pas à elle seule le problème, car il n'y a toujours pas de compréhension claire concernant l'adaptation psychologique de l'individu au sexe désigné. La clinique des variations du développement sexuel chez un nouveau-né, un enfant ou un adolescent peuvent provoquer un traumatisme émotionnel chez les parents, en vue de l'environnement social et de la culture actuelle manquant de connaissances sur les DSD, induisant ainsi, des réactions de préjugés contre l'enfant et sa famille. De ce fait, la prise en charge vise à l'accompagnement autant de la personne concernée que de sa famille (Phan-Hug *et al.*, 2016 ; Lubianca *et al.*, 2017).

La prise en charge psychologique dépend du patient et dure généralement plusieurs années mais cela peut être différent selon les cas. Au cours de cette période, le psychiatre investigate les représentations et les sentiments liés à cette différence et l'acceptation du soi. L'importance du rôle psychiatre selon l'âge et le développement sexuel. Le moment clé de la prise en charge est l'adolescence dans lequel les enfants présentant un DSD débutent leur puberté (développement des organes génitaux, pilosité, mue de la voix et changement de la morphologie). C'est à ce moment-là que la prise en charge est cruciale tant au niveau endocrinologique que psychologique (Kleinemeier *et al.*, 2010 ; Liao *et al.*, 2010).

Partie pratique

Patients et méthodes

Une étude clinique et moléculaire, de type descriptif et analytique, a été menée sur un total de 125 patients présentant un diagnostic clinique de DSD et a été établie et évaluée en un espace de temps de 3 ans (Janvier 2018- Mars 2021).

La collecte des données épidémiologiques et cliniques ainsi que des échantillons sanguins a été réalisée au niveau de divers hôpitaux/cliniques de l'Est et du Centre algériens. L'extraction d'ADN, la confirmation de la présence du gène *SRY* par une PCR (*polymerase chain reaction*) conventionnelle et des tests cytogénétiques ont été réalisés au niveau du laboratoire de biologie et génétique moléculaire - services de biochimie et d'hormonologie du CHU IBN BADIS - Constantine 3.

L'analyse du WES, l'étude fonctionnelle *in silico* ainsi que le séquençage Sanger ont été entrepris à l'unité de génétique du développement humain à l'institut Pasteur – Paris - France, sur une période de 14 mois.

1. Recrutement des patients

La population d'intérêt comprend 125 patients, parmi lesquels 5 cas familiaux et une paire de jumeaux monozygotes discordants pour le phénotype DSD, a été recrutée au niveau des :

- services d'endocrinologie-diabétologie, néonatalogie et pédiatrie du CHU IBN BADIS - Constantine 3,
- services de pédiatrie de :
 - hôpital Mohammed BOUDIAF - El Khroub - Constantine,
 - CHU Lamine DEBAGHINE - Bab El Oued - Alger,
 - hôpital Mohamed Seddik BEN YAHIA - Jijel,
 - hôpital Bachir MENTOURI - El Milia - Jijel,
- clinique Nissia - Djebel Ouahch - Constantine,
- clinique El Anouar - Mansourah - Constantine,
- clinique Naoufel - Zouaghi - Constantine.

Critère d'inclusion :

- patients atteints de DSD d'étiologie inconnue.

Critères d'exclusion :

- patients présentant un DSD avec une anomalie du nombre des chromosomes sexuels,
- patients diagnostiqués avec une HCS ou une exstrophie cloacale.

Un questionnaire dûment renseigné et un consentement éclairé ont été obtenus auprès de chaque individu ou d'un parent/tuteur (patient de moins de 18 ans), afin de déterminer l'implication de certains facteurs génétiques et environnementaux dans l'apparition des DSD (Annexes 2 et 3).

2. Méthodes

2.1 Prélèvement sanguin

Le prélèvement du sang a été effectué dans des conditions stériles. Par voie veineuse, le sang a été recueilli pour chaque patient ainsi que pour chaque membre de sa famille présent, dans 2 tubes Vacutainer de 5 ml contenant l'anticoagulant EDTA (*ethylene diamine tetra-acetic acid*), un inhibiteur de l'action des enzymes DNase ou nucléases. Les tubes ont ensuite été conservés à +4°C pendant 10 jours au maximum.

Afin de réaliser un caryotype pour les patients avec un sexe génétique indéterminé, une prise de sang veineux dans un tube Vacutainer hépariné (l'héparine de lithium) pour chaque patient, a été menée en respectant les conditions d'asepsie. Le sang recueilli peut être conservé à +4°C pour une durée maximale de 4 jours, jusqu'à la certitude d'avoir obtenu une bonne culture cellulaire.

2.2 Analyse cytogénétique

Le caryotype se définit par l'analyse numérique et structurale de l'ensemble des chromosomes d'une cellule d'un individu, classés en plusieurs groupes et numérotés selon l'ISCN 2016 (*international system for human cytogenetic nomenclature*).

L'établissement du caryotype pour les cas de DSD est une étape cruciale et indispensable pour définir le sexe génétique, qui se réalise sur des cellules nucléées (lymphocytes) capables de se diviser *in vitro*, comme suit :

- mise en culture des lymphocytes dans un milieu RPMI (*roswell park memorial institute medium*), du sérum de veau fœtal, un agent mitogène : phytohémagglutinine (PHA), et des antibiotiques. Cette étape doit se réaliser dans une asepsie rigoureuse, en respectant des conditions précises de température, pH, CO₂, humidité, etc.
- incubation de 72 heures,
- blocage des divisions cellulaires en métaphase par la colchicine, une substance inhibitrice de la polymérisation de la tubuline et donc la formation du fuseau mitotique,

- induction d'un choc hypotonique par le KCl, induisant le gonflement et la lyse des lymphocytes et la libération des chromosomes métaphasiques,
- fixation des chromosomes,
- étalement sur lame et coloration par Giemsa,
- marquage des chromosomes (*R-banding*),
- lecture des lames sous microscope optique.

Le protocole détaillé est illustré en annexe 4.

2.3 Analyse moléculaire

Après l'extraction de l'ADN génomique, les analyses moléculaires élaborées dans cette investigation consistent à déterminer en 3 temps:

- la présence du gène *SRY* par la PCR conventionnelle,
- les variants des gènes liés aux DSD par analyse de l'ensemble de données résultant du WES en fonction des données cliniques de chaque patient,
- la présence des variants identifiés, par le séquençage Sanger, chez le patient ainsi que chez le(s) parent(s) et/ou la fratrie disponible(s).

2.3.1 Extraction de l'ADN génomique

La procédure d'extraction au NaCl de l'ADN leucocytaire pratiquée dans cette étude comprend cinq étapes majeures :

- hémolyse du sang et préparation du culot leucocytaire,
- lyse des leucocytes, digestion du complexe nucléoprotéique et libération de l'ADN,
- extraction et purification de l'ADN,
- précipitation de l'ADN,
- solubilisation de l'ADN purifié.

Un protocole détaillé de ces étapes est décrit en annexe 5.

La concentration des ADN est ensuite dosée par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop 1000 v3.7 (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA*).

2.3.2 PCR du gène *SRY*

La technique PCR est une réaction d'amplification enzymatique *in vitro* en exponentielle (2^n) (n = le nombre de cycles nécessaire) d'un segment d'ADN compris entre deux régions d'une séquence connue, par un procédé d'extension d'amorces.

Les amorces pour une séquence de 272 pb du gène *SRY*, choisies à l'aide du logiciel Primer3web (<https://primer3.ut.ee/>), sont illustrées ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2. Amorces utilisées pour la PCR d'un amplicon de 272 pb du gène *SRY*

Amorces	Longueurs (pb)	Températures °C	% en GC	Séquences (5'-3')
F	21	60,9	47,6	GGCTCACTTCTGGATGTCTTA
R	21	60,0	28,5	AAAATTGGCGATTAAGTCAAA

F : forward, R : reverse

Cette technique enzymatique nécessite un mélange réactionnel (mix) comprenant tous les réactifs essentiels pour le bon déroulement de l'amplification. Pour chaque patient, le mix de PCR pour l'amplicon du gène *SRY* est composé des réactifs mentionnés dans le tableau 3.

Tableau 3. Constituants du milieu réactionnel pour la PCR du gène *SRY*

Réactifs	Quantités
Eau distillée ou bidistillée	4,02 µl
dNTP (0,2mM finale)	1,6 µl
MgCl ₂ (1,5mM finale)	0,3 µl
Tampon (10X)	1 µl
Amorces F (100 ng/µl finale)	1 µl
Amorces R (100 ng/µl finale)	1 µl
Taq polymérase (5u/µl)	0,08 µl
Total	9 µl

Dans un microtube de 0,2 ml, 1 µl d'ADN dilué à 20-30 ng/µl en fonction de sa concentration initiale est ajouté à 9 µl du mix.

Dans un thermocycleur, l'ensemble des microtubes à PCR est soumis à une série de cycles de températures afin d'obtenir une quantité suffisante de la séquence d'ADN d'intérêt. Chaque cycle représente une succession de trois réactions : une dénaturation des brins d'ADN, une hybridation des amorces et une élongation.

Les conditions d'amplification de la séquence du gène *SRY* sont de 94°C pendant 4 minutes puis 35 cycles avec une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation des amorces à 61,5°C pendant 30 secondes et une polymérisation du fragment à 72°C pendant 30 secondes puis une élongation finale à 72°C pendant 4 minutes.

Afin de vérifier la taille des amplicons, 7 µl de chaque produit de PCR mélangés à 3 µl du marqueur de mobilité BBP (bleu de bromophénol) sont déposés dans un puits du gel d'agarose à 2% (2 g d'agarose+ 100 ml de TBE (tris borate EDTA) à 1X). Ce dernier contient 10µl de l'intercalant BET (bromure d'éthidium) qui se fixe entre les bases nucléiques, rendant l'ADN fluorescent sous UV. La réservation de 3 puits pour le marqueur de taille à 100 pb, le témoin positif et le témoin négatif sont essentiel pour chaque étude moléculaire.

Les échantillons déposés dans le gel sont ensuite soumis à un système de migration en fonction de leur taille et de leur charge électrique, sous un courant de 100 volts pendant 45 minutes. Afin de visualiser les bandes d'ADN fluorescentes, le gel est éclairé sous UV, après la migration électrophorétique (Figure 8).

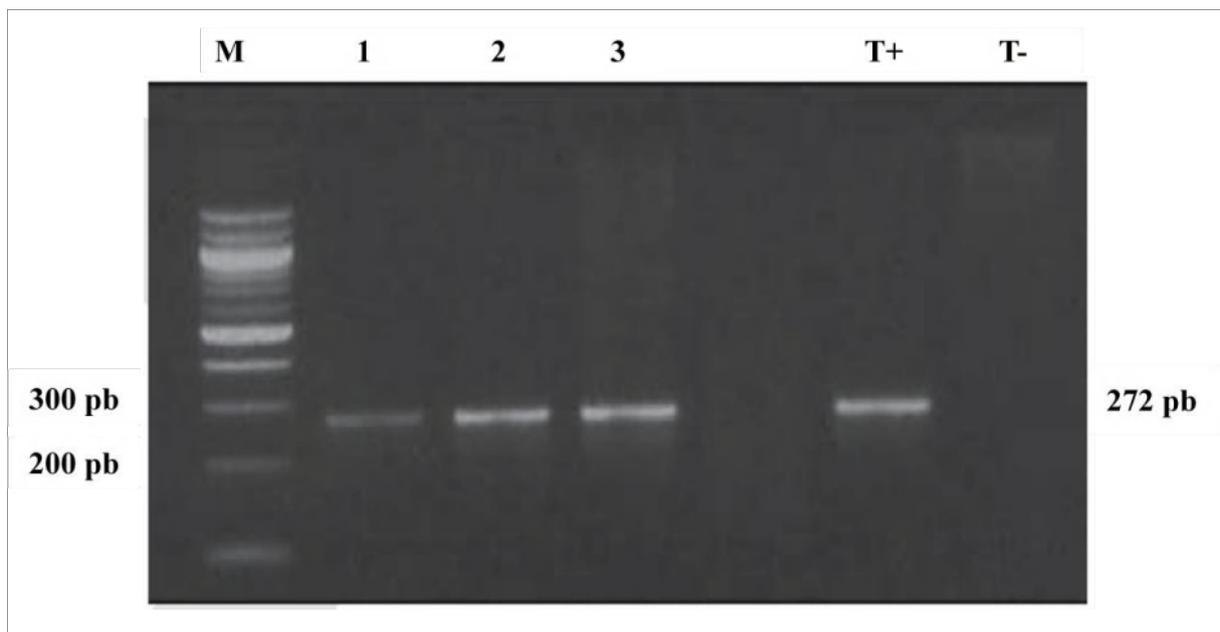


Figure 8. Profil électrophorétique de la PCR d'une séquence de 272 pb du gène *SRY* (Chellat *et al.*, 2013, modifié)

1-3: patients, M : marqueur de taille de 100 pb, T+ : témoin positif, T- : témoin négatif

2.3.3 Préparation des échantillons pour le WES

Le dosage de la concentration et de la pureté des échantillons d'ADN, par spectrophotométrie est essentiel pour le bon déroulement de la technique WES. La mesure de la densité optique (DO) ou de l'absorbance de l'ADN à 260 nm et à 280 nm est effectuée à l'aide du Nanodrop 1000 v3.7 (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA*), afin de déterminer la pureté de l'ADN extrait, en se référant aux 2 rapports (R_1 et R_2) :

- $R_1 = 260/280$: rapport de l'absorbance de l'échantillon à 260 et 280 nm. Celui-ci est utilisé pour évaluer la pureté de l'ADN et de l'ARN. Un rapport de $\sim 1,8$ est généralement accepté comme "pur" pour l'ADN, et un rapport de $\sim 2,0$ est généralement accepté comme "pur" pour l'ARN. Si le rapport est sensiblement inférieur cela peut indiquer la présence de protéines qui absorbent à 280 nm, de phénol à 270 nm ou d'autres contaminants qui absorbent fortement à ou près de 280 nm,
- $R_2 = 260/230$: rapport de l'absorbance de l'échantillon à 260 et 230 nm. Il s'agit d'une mesure secondaire de la pureté de l'acide nucléique. Les valeurs 260/230 pour un acide nucléique "pur" sont souvent plus élevées que les valeurs 260/280 respectives. Elles se situent généralement entre 1,8 et 2,2. Si le rapport est sensiblement inférieur, cela peut indiquer la présence de contaminants.

A une concentration finale de 45-50 ng/ μ l, 195 échantillons d'ADN (parmi plus que 350 collectés), ont été sélectionnés en fonction de la qualité d'ADN pour l'envoi au WES (Tableau 4), soit :

- 125 ADN de patients DSD,
- les membres de famille « père, mère et fratrie » de 34 patients mentionnés ci-dessous selon les critères phénotypiques et la disponibilité des ADN (Tableau 4).

Tableau 4. Résumé de l'ensemble des échantillons d'ADN collectés et analysés

Cohorte	Echantillons d'ADN collectés				Total	Echantillons d'ADN envoyés au WES			
	Patient(s) en solo	Patient(s) en duo	Patient(s) en trio	Patient(s) en trio avec		Patient(s) en solo	Patient(s) en duo	Patient(s) en trio	Patient(s) en trio avec fratrie
DSD 46,XY									
1. Anomalies du développement gonadique	2	2	5	6	15	9	1	3	2
2. Syndrome de persistance des canaux müllériens	0	0	1	0	1	0	0	1	0
3. Autres types de DSD	17	9	31	10	67	55	0	8	4
4. DSD syndromiques	5	8	18	8	39	27	1	9	2
Total	24	19	55	24	122	91	2	21	8
DSD 46,XX									
1. DSD ovotesticulaire	0	0	0	1	1	0	0	1	0
2. DSD testiculaire	0	0	0	2	2	0	0	0	2
Total	0	0	0	3	3	0	0	1	2
Total global	24	19	55	27	125	91	2	22	10

Patient en solo : uniquement l'individu atteint, **patient en duos** : l'individu atteint et un parent, **patient en trios** : l'individu atteint et ses deux parents, **patient en trios avec fratrie** : l'individu atteint, ses deux parents avec au minimum un frère ou une sœur

Pour chaque individu, 25-30 µl d'ADN sont mis dans un tube de stockage de 2 ml. Celui-ci est étiqueté selon les recommandations du laboratoire et envoyé à la boîte de séquençage.

2.3.4 Séquençage de l'exome entier « WES »

2.3.4.1 Principe de la technique du WES

Les techniques de séquençage massif en parallèle (NGS) représentent la révolution biotechnologique de ces dernières années qui permet de séquencer de grandes quantités d'ADN en un temps record, et d'augmenter particulièrement le nombre des gènes et des voies impliqués dans la détermination et la différenciation sexuelles.

Comme première étape du diagnostic moléculaire dans ce travail, nous avons procédé à une des techniques du NGS : le séquençage de l'exome entier (WES) qui est largement utilisé dans la recherche, et plus récemment dans le diagnostic génétique des DSD.

Cette technique permet d'analyser de façon exhaustive les séquences codantes du génome ainsi que leurs régions introniques flanquantes en mettant en évidence les variants non synonymes, les variants des sites d'épissage (jusqu'à 10 paires de bases) et les petits variants InDel (insertion-délétion) présents à une fréquence inférieure à 1% dans le projet de séquençage d'Exome (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>) et le projet 1000 génomes (<http://1000genomes.org>).

2.3.4.2 Technique de séquençage de l'exome entier (WES)

Le séquençage de l'exome des 195 échantillons d'ADN a été réalisé par la plateforme Illumina HiSeq2000, avec un kit TruSeq v3, après l'enrichissement des exons à l'aide du kit Agilent SureSelect Human All Exon V4 Paired-end, comme suit :

- fragmentation de l'ADN génomique d'une taille moyenne de 150-200 pb,
- dénaturation des fragments d'ADN,
- hybridation des fragments d'ADN avec des oligos de capture qui sont des adaptateurs ajoutés par ligation pendant la préparation de la bibliothèque pour le séquençage à haut débit,
- enrichissement des séquences capturées avec des billes paramagnétiques conjuguées à la streptavidine,
- amplification des séquences à analyser par PCR en émulsion (emPCR) : grâce à la formation d'une émulsion (mélange huile/eau), un fragment d'ADN et une bille (servant à lier le fragment d'ADN à son adaptateur) sont capturés au sein d'une goutte. Après plusieurs étapes d'amplification par PCR, il y a obtention de nombreux amplicons à la surface de la bille, qui, avec les fragments amplifiés sont sélectionnées par formation d'un complexe biotine-streptavidine,
- séquençage Illumina, basé sur la détection de photons, est équivalent au séquençage Sanger (défini ci-après) (Figure 9).

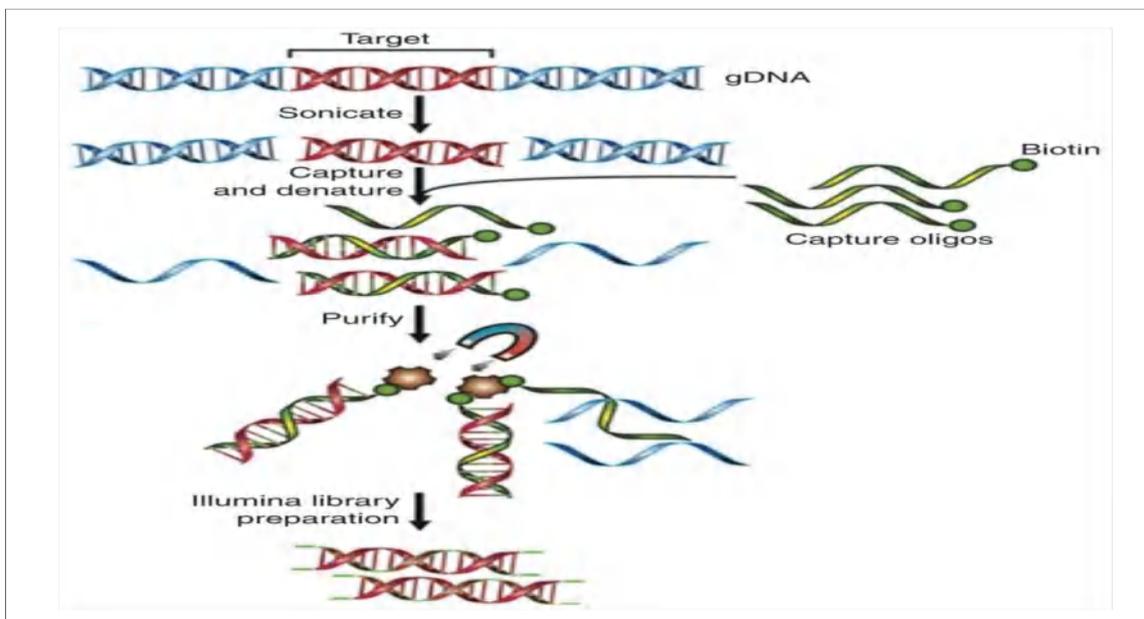


Figure 9. Schéma commun pour la méthode d'enrichissement de l'exome entier basée sur l'hybridation des séquences cibles

Séquence d'ADN en rouge : séquence à analyser, **séquence d'ADN en bleu :** séquence à ne pas analyser,
oligos simple brin en vert : sondes de capture marquées à la biotine ;
particules brunes : billes paramagnétiques conjuguées à la streptavidine

Le protocole du traitement des données générées, utilisé par la boîte de séquençage en charge est détaillé en annexe 6.

2.3.5 Analyse des données du WES

Il s'agit de la première étude réalisée en Afrique utilisant l'approche « WES » pour l'analyse d'une large cohorte de patients avec DSD.

2.3.5.1 Annotation des variants

Afin de mettre en évidence les variants causaux des différents phénotypes DSD dans notre population d'étude, les données du WES sous format de fichier VCF (*variant calling format*) sont listées dans un tableau de type Excel. Ce fichier possède au minimum 7 champs fixes: le numéro du chromosome, la position du variant, le numéro rs (*reference dbSNP*), la base de référence, la base alternative, la qualité moyenne des bases alternatives et les critères de passage du filtre prédéfini (Figure 10). D'autres champs optionnels sont cités ultérieurement.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Priority	CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	GeneName
2	H	20	34828320	rs747984876	A	T	3178.77	PASS	AAR2
3	H	17	48738330	rs143968667	G	A	400.77	PASS	ABCC3
4	H	3	52012023	.	C	T	496.77	PASS	ABHD14A-AC
5	H	4	8376819	rs199766636	G	A	919.77	PASS	ACOX3
6	H	11	130298051	rs555787886	G	A	197.77	PASS	ADAMTS8
7	H	5	7804812	rs61215232	C	T	683.77	PASS	ADCY2
8	H	2	100210385	.	G	A	153.77	PASS	AFF3
9	H	2	236626225	rs201400274	G	A	399.77	PASS	AGAP1
10	H	1	36367545	rs143106048	G	T	860.77	PASS	AGO1
11	H	11	62300178	.	T	C	463.77	PASS	AHNAK
12	H	11	62287758	rs144063659	T	A	2324.77	PASS	AHNAK
13	H	1	46035621	rs142530083	C	T	888.77	PASS	AKR1A1
14	H	11	107396311	rs61743188	A	C	507.77	PASS	ALKBH8
15	H	2	73678642	rs188807564	C	T	1190.77	PASS	ALMS1
16	H	17	7984203	rs149039053	C	T	735.77	PASS	ALOX12B
17	H	17	8013522	.	G	A	2592.77	PASS	ALOXE3
18	H	2	202211407	.	C	G	678.77	PASS	ALS2CR12
19	H	3	134079209	rs35938212	G	A	618.77	PASS	AMOTL2
20	H	15	65218320	rs74528237	C	T	627.77	PASS	ANKDD1A

Figure 10. Exemple d'une partie d'un fichier VCF sous format d'un tableau Excel indiquant les champs indispensables pour la description d'un nombre de SNP déterminés chez un patient

Priority : priorité du SNP élevée (H), modérée (M) ou basse (L), **CHROM** : numéro du chromosome, **POS** : position absolue du SNP sur le chromosome, **ID** : identifiant du SNP par rapport au numéro de référence dbSNP, **REF** : base de référence, **ALT** : base alternative, **QUAL** : qualité moyenne des bases alternatives, **FILTER** : critères de passage du filtre prédéfini, **GeneName** : nom du gène

Ce type de fichier permet de filtrer les variants selon les critères choisis à l'aide de différents outils disponibles, de la manière suivante:

- trier les variants présentant une priorité élevée (H),
- éliminer les variants synonymes,
- exclure les variants avec une fréquence allélique élevée (MAF >1% ; *minor allele frequency*) dans la population mondiale et la population africaine selon le projet ExAC (*exome aggregation consortium*), nommés respectivement « ExAC_ALL » et « ExAC_AFR » dans le fichier VCF (Figure 11).

	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
1	GeneName	Func	Gene	GeneDetail	ExonicFunc	AAChange	Gencode	cytoBand	ExAC_ALL	ExAC_AFR	ExAC_AMR	ExAC_EAS	ExAC_FIN	ExAC_NFE
2	AAR2	exonic	NM_0012711.		missense SN	AAR2:NM_0012711.1	ENST000003	20q11.23	8.243e-06	0	0	0	0	0 1.5e-05
3	ABCC3	exonic	NM_0011444.		missense SN	ABCC3:NM_0011444.1	ENST000002	17q21.33	0.0002	0.0024	0	0 0.0001	0	0 3.04e-05
4	ABHD14A-AC	exonic	NM_001316.		stopgain	ABHD14A-AC	ENST000004	3p21.2						
5	ACOX3	exonic	NM_0011011.		missense SN	ACOX3:NM_0011011.1	ENST000003	4p16.1	0	0	0	0	0	0
6	ADAMTS8	exonic	NM_007037.		missense SN	ADAMTS8:NM_007037.1	ENST000002	11q24.3	0	0	0	0	0	0
7	ADCY2	splicing	NM_020546	NM_020546.			ENST000003	5p15.31	0.0005	0.0058	0.0003	0	0	0 3.021e-05
8	AFF3	exonic	NM_001025.		missense SN	AFF3:NM_001025.1	ENST000004	2q11.2						
9	AGAP1	exonic	NM_001037.		missense SN	AGAP1:NM_001037.1	ENST000003	2q37.2	0.0009		0 0.0015	0	0	0 0.0012
10	AGO1	splicing	NM_001317	NM_001317.			ENST000003	1p34.3	0.0003	9.777e-05	0.0005	0	0	0 0.0003
11	AHNAK	exonic	NM_001620.		missense SN	AHNAK:NM_001620.1	ENST000003	11q12.3						
12	AHNAK	exonic	NM_001620.		missense SN	AHNAK:NM_001620.1	ENST000002	11q12.3	0.0006	9.614e-05	0.0003	0	0	0 0.0010
13	AKR1A1	exonic	NM_001202.		missense SN	AKR1A1:NM_001202.1	ENST000003	1p34.1	0.0008	0.0081	0.0013	0.0001	0	0 1.499e-05
14	ALKBH8	exonic	NM_001301.		missense SN	ALKBH8:NM_001301.1	ENST000004	11q22.3	0.0012	0.0066	0	0	0	0 0.0004
15	ALMS1	exonic	NM_015120.		missense SN	ALMS1:NM_015120.1	ENST000002	2p13.1	0.0007	0.0086	0.0002	0	0	0 3.02e-05

Figure 11. Exemple d'une partie d'un fichier VCF indiquant les paramètres d'un nombre de SNP déterminés chez un patient

GeneName : nom du gène, **Func** : fonction du SNP selon sa localisation (exonique/intronique),

Gene/GeneDetail : référence de la séquence du transcrypt correspondant à 100% à la séquence et la structure exon/intron du projet MANE (matched annotation between NCBI and EBI - Ensembl),

ExonicFunc : détails de la fonction du SNP dans la séquence exonique/intronique,

AAchange : changement de l'acide aminé engendré par le SNP, **Gencode** : identifiant du transcrypt par rapport à Ensembl, **cytoBand** : segment chromosomique où se situe le SNP, **ExAC_ALL** : fréquence allélique dans la population mondiale, **ExAC_AFR** : fréquence allélique dans la population africaine,

ExAC_AMR : fréquence allélique dans la population américaine mixte, **ExAC_EAS** : fréquence allélique dans la population asiatiques de l'Est, **ExAC_FIN** : fréquence allélique dans la population finlandaise,

ExAC_NFE : fréquence allélique dans la population européenne non finlandaise

Le projet ExAC est une coalition de scientifiques pour l'agrégation et l'harmonisation des données de séquençage de l'exome à partir d'une grande variété de projets de séquençage à l'échelle mondiale (ExAC_ALL) ainsi que des groupes de populations disponibles à ce jour: ExAC_AFR (Africains), ExAC_AMR (mixte d'Américains), ExAC_EAS (Asiatiques de l'Est), ExAC_SAS (Asiatique du Sud), ExAC_FIN (Finlandais), ExAC_NFE (Européen non Finlandais) et ExAC_OTH (autres).

2.3.5.2 Analyse fonctionnelle *in silico*, interprétation des données et prédiction de la pathogénicité

Conformément aux données cliniques de chaque patient, les variants résultants sont manipulés comme suit :

- accorder la liste des gènes du fichier VCF au phénotype décrit en utilisant le site VarElect (<https://varelect.genecards.org/>), un outil robuste servant de guide pour classer les gènes, en notant leur probabilité d'être liés à l'anomalie étudiée. Dans cette étude, nous avons utilisé les mots clés en liaison avec les phénotypes DSD tels que « *gonad* », « *testis* », « *ovary* », « *genitalia* », « *vagina* » et « *uterus* » et ceux liés aux phénotypes somatiques pour les cas syndromiques tels que « *eye* », « *bone* », « *heart* » et « *kidney* »,
- sélectionner la liste des gènes candidats au phénotype,
- vérifier l'implication de ces gènes et leurs modes de transmission selon la base de données publique OMIM (*online mendelian inheritance in man*) comprenant également les informations bibliographiques des gènes humains et des troubles génétiques résumées sous forme de textes et accompagnés de nombreux liens tels que les références PubMed.
- annoter les variants susceptibles d'être impliqués dans l'apparition d'une anomalie/maladie à l'aide du numéro rs, en prédisant:
 - l'effet de chaque variant au niveau protéique *via* la base de données gnomAD (*genome aggregation database* ; <https://gnomad.broadinstitute.org/>), une source de données plus riche que le projet ExAC, qui regroupe environ 16 000 génomes et plus que 125 000 exomes entiers des populations européennes, latino-africaines, afro-américaines, asiatiques du Sud, asiatiques de l'Est, juives ashkénazes et autres. GnomAD englobe 241 millions de variants (SNP et petites InDel), et plus que 335 000 variants structurels (réarrangements d'ADN d'au moins 50 paires de bases). Ces données permettent à ce consortium de concevoir un catalogue des différents types de variations génétiques, de déterminer leurs fréquences alléliques dans les populations citées ci-dessus et de révéler leurs impacts fonctionnels sur les protéines selon les outils de prédiction SIFT (*sorting in tolerant from tolerant*) et PolyPhen (*polymorphism phenotyping*),

- le degré de pathogénicité du variant selon :
 - la base de données ClinVar (*clinical significances of variants*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) archivant les interprétations proposées sur la signification clinique et/ou fonctionnelle des variants géniques et leurs relations avec la santé humaine,
 - le score REVEL (*rare exome variant ensemble learner*), définie par un ensemble de méthodes pour prédire l'implication des variants faux-sens rares dans la manifestation des pathologies en combinant les données de plusieurs outils de prédiction tels que SIFT et PolyPhen,
 - le guide de l'ACMG (*american college of medical genetics and genomics*), étant un ensemble de critères établis par des cliniciens, des généticiens et des bioinformaticiens, permet d'établir la classification des variants pathogènes et probablement pathogènes, considérés comme cliniquement significatifs après une corrélation génotype-phénotype,
 - la présence ou l'absence du variant d'intérêt chez les parents et la fratrie disponibles, en utilisant l'outil de comparaison des listes de gènes « *multiple list comparator* » (<https://molbiotools.com/listcompare.php>) (Figure 12).

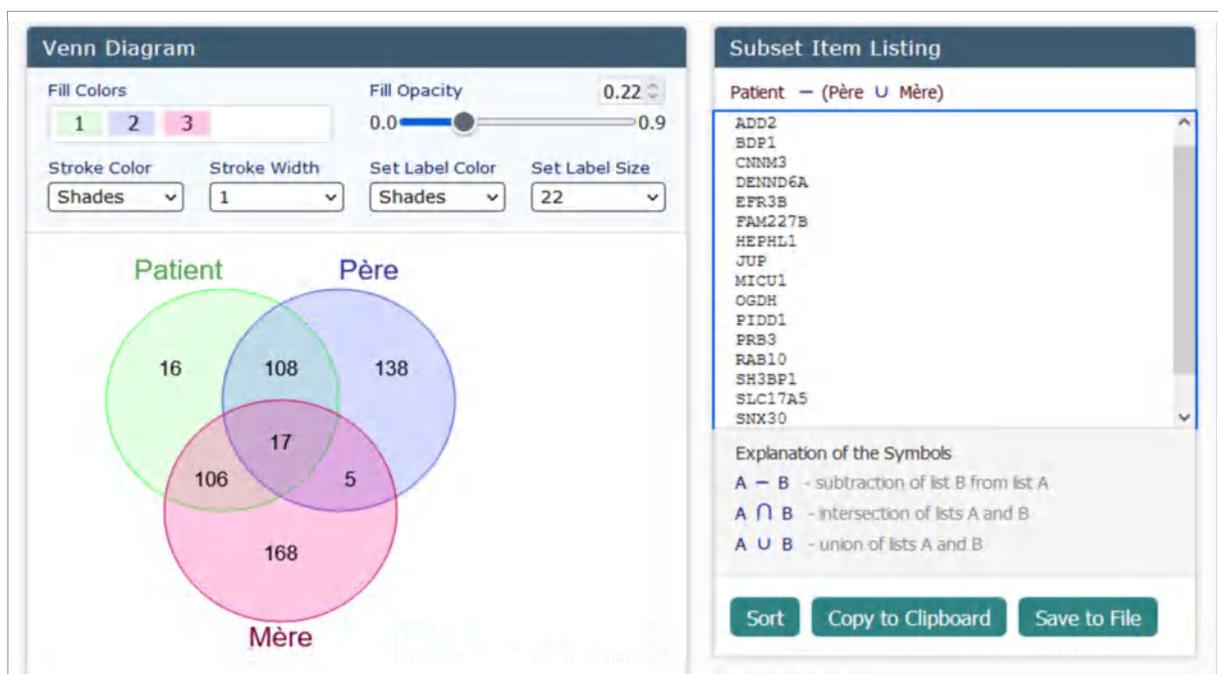


Figure 12. Exemple d'une comparaison de la liste des SNP des gènes d'un patient avec celles de ses parents en utilisant l'outil « *multiple list comparator* »

*Parmi les SNP des 247 gènes filtrés chez ce patient, **16** sont *de novo* (mentionnés en Subset Item Listing), **17** sont homozygotes (présents chez le père et la mère), **108** sont communs entre le patient et son père et **106** sont communs entre le patient et sa mère

Au final, cette interprétation peut être confirmée en déterminant la ségrégation de ces variants par le séquençage Sanger (détailé ci-dessous), en fonction de la disponibilité des ADN des parents et de la fratrie.

2.3.6 Séquençage Sanger

Pour confirmer la présence des variants pertinents et déterminer leurs ségrégations. La préparation des échantillons d'ADN pour l'envoi à la boîte de séquençage s'est déroulée de la manière suivante :

- désigner les couples d'amorces encadrant le variant d'intérêt *via* le site Prime3web (<https://primer3.ut.ee/>) pour des amplicons de 300-400pb,
- réaliser une PCR standard selon les conditions de chaque couple d'amorces désigné, en préparant le mix composé des réactifs mentionnés ci-dessous (Tableau 5).

Tableau 5. Composants du milieu réactionnel pour les PCR des gènes à séquencer

Constituants	Quantités
Eau ultra pure Milli-Q	8,4 µl
dNTP (0,2 mM finale)	4,8 µl
MgCl ₂ (1,5 mM finale)	0,9 µl
Tampon (10X)	3 µl
Amorce F (100 ng/µl finale)	3 µl
Amorce R (100 ng/µl finale)	3 µl
Bétaine (0,6 mM finale)	3,6 µl
Taq polymérase (5 u/µl)	0,3 µl
Total	27µl

- mettre dans un microtube de 0,2 ml, 3µl d'ADN dilué à 10 – 20 ng/µl en fonction de sa concentration initiale avec 27µl du mix,
- soumettre les microtubes à une série de cycles de températures selon les conditions d'amplification mentionnées par le fabricant de chaque couple d'amorces, afin d'obtenir une quantité suffisante de la séquence d'ADN pour l'envoi à la boîte de séquençage,
- vérifier la taille des amplicons par électrophorèse en appliquant les étapes citées précédemment pour la PCR du gène *SRY*.

La technique de Sanger automatisée est basée sur la synthèse enzymatique d'un néo-ADN en présence d'un ADN matrice, de dNTP (désoxyribonucléotides) et de dNTP modifiés en ddNTP (didésoxyribonucléotides) interrompant l'élongation des brins d'ADN néo-synthétisés. Ces ddNTP sont marqués par des fluorophores émettant un signal de fluorescence à 4 longueurs d'ondes différentes en fonction du type du nucléotide. Les fragments de tailles variables sont séparés par électrophorèse capillaire, les résultats sont obtenus par lecture successive des signaux de fluorescence à la sortie du capillaire et sont ensuite illustrés sous forme d'électrophorégramme après traitement informatique. La méthode utilisée par la boîte de séquençage est détaillée en annexe 7.

Dans cette étude, la préparation des produits de PCR selon les conditions imposées par la boîte de séquençage a été réalisée comme suit :

- étiqueter les tubes et les enregistrer sur la plateforme de la boîte de séquençage,
- mettre au minimum 15 µl du produit de PCR dans un tube Eppendorf de 1,5 ml,
- mettre 4 µl d'amorces F dilués à 1/10 dans un autre tube Eppendorf de 1,5ml,
- envoyer les tubes à la boîte de séquençage,
- lire les électrophérogrammes reçus sous format de fichier « .ab1 » par le logiciel *Sequencher* version 5.2.4 afin de confirmer la présence des variants d'intérêt et déterminer leur transmission (Figure 13).

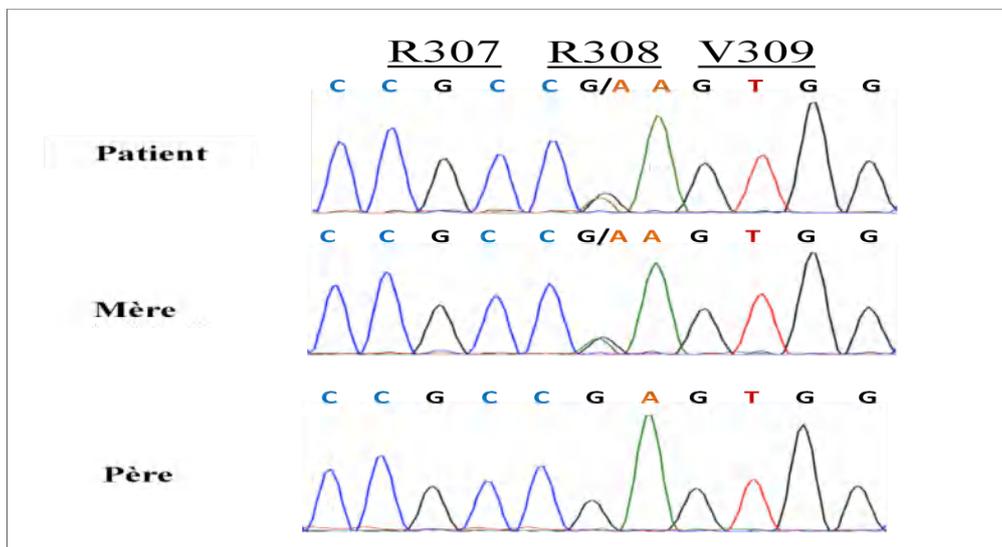


Figure 13. Exemple d'électrophérogrammes obtenus d'une séquence du gène *DHX37* présentant un variant (p.R308Q) à l'état hétérozygote chez un patient transmis par sa mère et absent chez son père (Zidoune *et al.*, 2021, modifié)

Enfin, établir une liste définitive des variants expliquant partiellement ou totalement le phénotype étudié.

Résultats et discussion

1. Vue globale de la cohorte

1.1 Répartition des patients selon leur origine

Après compilation des données à partir du questionnaire établi pour cette étude, notre cohorte comporte 125 patients atteints de DSD couvrant 24 villes illustrées ci-dessous (Figure 14).

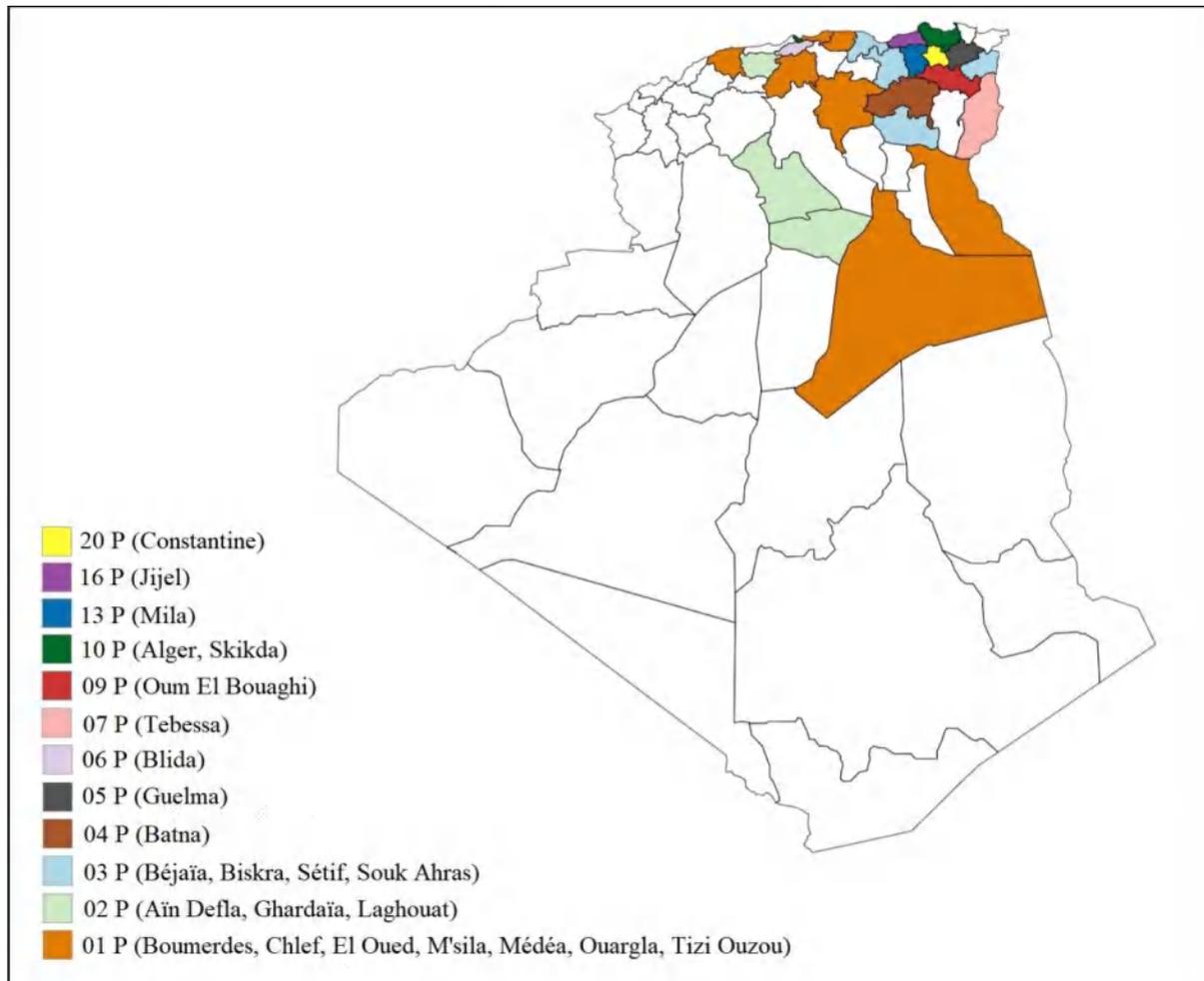


Figure 14. Répartition des patients en fonction de leurs origines

P : patient(s)

1.2 Répartition des patients selon les données cliniques et moléculaires

L'âge et le sexe attribués au moment du diagnostic, le diagnostic initial, les variants identifiés pour chaque patient, ainsi que leur fréquence allélique, impact prédit au niveau de la protéine, zygosity, mode de transmission, origine parentale et signification clinique ont été mis en évidence dans cette étude.

Les manifestations cliniques des DSD sont hétérogènes et les patients peuvent se présenter chez le clinicien à n'importe quel âge : au stade néonatal, à l'adolescence ou à l'âge adulte (Mazen *et al.*, 2021). Dans notre population d'étude, une vaste variation d'âge a été constatée au moment du diagnostic allant de 1 jour à 22 ans. Le motif de consultation a fait suite à la découverte, par les parents ou lors d'une consultation pédiatrique, gynécologique ou endocrinologique, d'une hypovirilisation des OGE, un hypospadias, lors de l'exploration d'un syndrome malformatif, une cryptorchidie ou bien suite à d'autres motifs tels que l'exploration d'une hernie inguinale, d'aménorrhée primaire ou de l'attitude du patient s'opposant à son sexe biologique et/ou son orientation sexuelle (Figure 15).

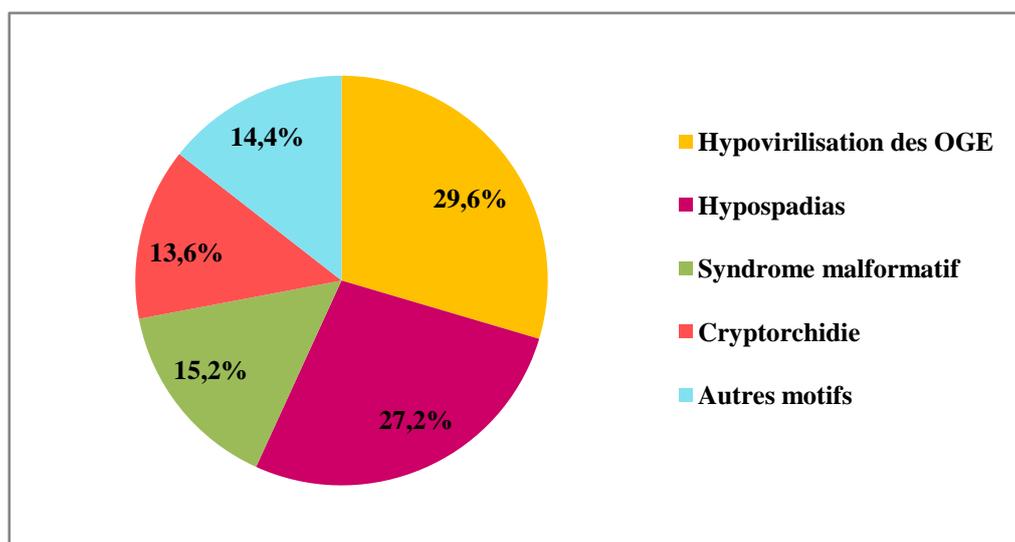


Figure 15. Répartition des patients selon les motifs de découverte du DSD

Il est connu qu'environ 75% des enfants présentant des DSD ont un caryotype 46,XY, 10-15% un 46,XX (dont la majorité présente une HCS) et le reste présente des anomalies structurales des chromosomes sexuels (Audi *et al.*, 2018).

La majorité de nos patients, soit 97,6% (122/125) de l'effectif, a reçu un diagnostic de DSD 46,XY selon la classification de Hughes *et al.* (2006) au « *Consensus Statement on Management of Intersex Disorders* », dont 13,1% (16/122) de ces patients ont été élevés filles. Ce groupe est subdivisé en cinq principales catégories:

- 15 patients, soit 12,3% du groupe, sont atteints d'anomalies du développement gonadique consistant en une agénésie gonadique ou une dysgénésie gonadique complète/partielle diagnostiquée sur la base des profils hormonaux et/ou du phénotype gonadique,

- 1 patient, soit 0,8% du groupe, est atteint du syndrome de persistance des canaux müllériens,
- 67 patients, soit 54,9% du groupe, présentant des organes génitaux externes atypiques, sont classés dans cette étude comme « autres types de DSD 46,XY ». Cette catégorie englobe les individus considérés comme ayant des troubles de synthèse/action d'androgènes ou diagnostiqués avec une hypovirilisation des OGE inexplicée ou les individus qui sont en cours d'exploration clinique,
- 39 patients, soit 32% du groupe, sont atteints de DSD syndromiques 46,XY. Cette catégorie comprend les sujets ayant reçu un diagnostic de DSD 46,XY associé à une obésité syndromique ou à une série de caractéristiques dysmorphiques (Figure 16.A).

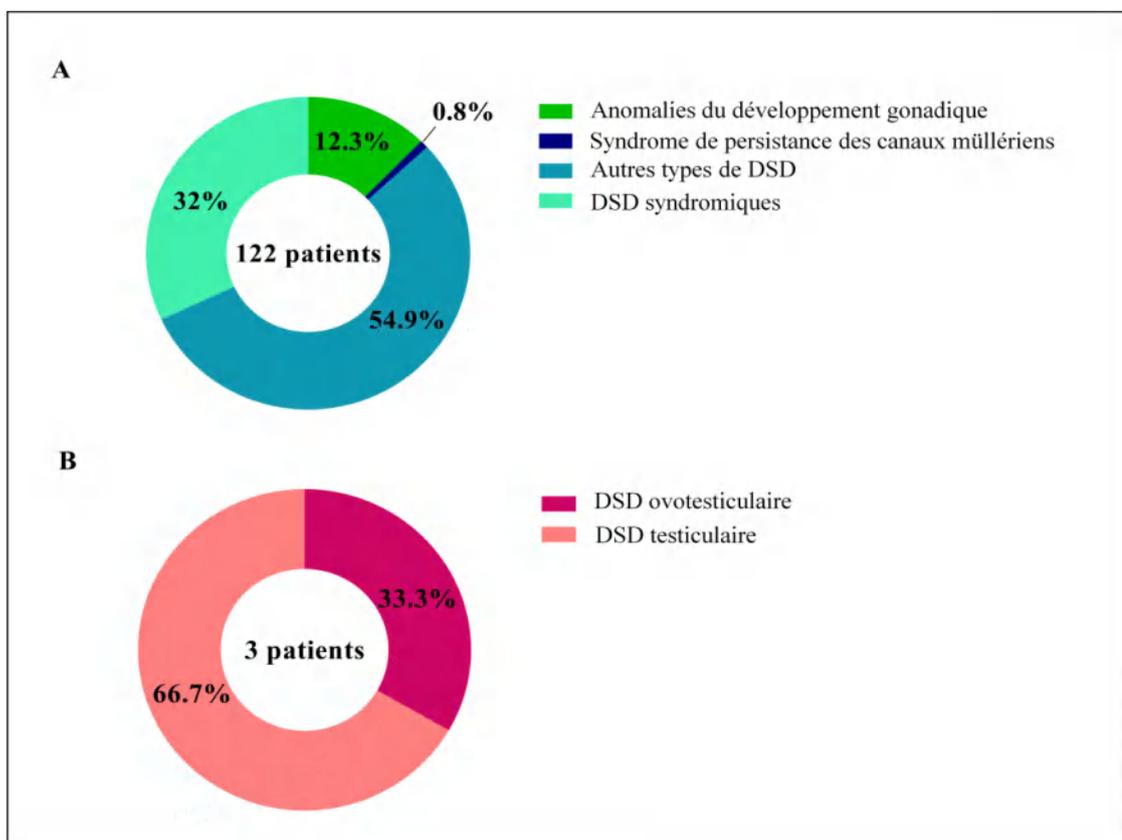


Figure 16. Répartition des patients selon les phénotypes DSD 46,XY et DSD 46,XX

(A) Proportions des 122 patients présentant les quatre catégories des phénotypes DSD 46,XY

(B) Proportions des 3 patients présentant les deux catégories des phénotypes DSD 46,XX

Une minorité de la cohorte, soit 2,4% (3/125) des patients représentent des patients diagnostiqués DSD 46,XX (*SRY* négatif) et élevés garçons, dont 2 présentant un DSD T et 1 avec un DSD OT (Figure 16.B).

1.3 Répartition des patients selon la consanguinité

L'histoire de la consanguinité parentale est rapportée chez 36% (45/125) des patients. Dans la littérature, les données sur la prévalence réelle des DSD dans les populations où les taux de consanguinité et d'endogamie sont élevés, sont largement indisponibles et limitées à des études publiées portant sur de faibles effectifs (Bashamboo et McElreavey, 2014 ; Romdhane *et al.*, 2019). En revanche, des taux plus élevés de DSD ont été notés dans les populations où la fréquence de consanguinité est remarquable. Dans une étude récente menée dans une population de 14 177 nouveau-nés turques, la fréquence de cette anomalie congénitale est de 1,3 pour 1 000 naissances, celle-ci est bien plus supérieure à celle rapportée dans des études précédentes (Aydin *et al.*, 2019). Parmi ces dernières, l'incidence de DSD en Arabie Saoudite est estimée à 1 pour 2 500 naissances vivantes, tandis qu'elle est de 1 pour 3 000 naissances vivantes en Egypte où le taux de consanguinité parentale est de 55% chez les patients atteints de maladies génétiques, y compris les formes récessives de DSD (Abdullah *et al.*, 1991 ; Mazen *et al.*, 2008 ; Afifi *et al.*, 2010).

Ces chiffres sont plus élevés que la fréquence rapportée dans les pays européens (1 pour 4 500-5 500 naissances vivantes), ce qui confirme que la consanguinité est un facteur contribuant à l'augmentation du taux d'incidence des DSD (Bashamboo et McElrevey, 2014). En outre, une étude menée en Allemagne révèle que l'incidence des DSD chez les enfants d'origine non allemande est quatre fois plus élevée que celle de la population générale, principalement en raison de taux de consanguinité plus élevés dans les communautés de migrants (Thyen *et al.*, 2006). De ce fait, il est clairement nécessaire de mener d'autres études pour déterminer la prévalence des DSD dans la communauté algérienne où le degré de consanguinité est élevé.

2. Etude cytogénétique

Etant donné que la technique du caryotype est très délicate, sensible et dépendant de plusieurs paramètres physiques et biochimiques, les cultures cellulaires réalisées sur nos échantillons étaient stériles. De ce fait, aucun résultat concluant n'a été enregistré dans cette étude, les formules chromosomiques ont été obtenues à partir des autres laboratoires de cytogénétique.

3. Analyse du WES et évaluation de la pathogénicité

Conformément aux recommandations établies en 2015 par l'ACMG (Richards *et al.*, 2015), les proportions des patients avec/ou sans variants impliquant les gènes d'intérêt ainsi que le nombre de ces variants aux différents niveaux de pathogénicité selon les 6 phénotypes de DSD sont résumés dans le tableau 6. Le diagnostic clinique initial et les données moléculaires pour chaque patient sont illustrés dans cette étude.

Tableau 6. Distribution des 125 patients ainsi que les variants identifiés en fonction des différents niveaux de pathogénicité et catégories de DSD

Cohorte	Patient(s) avec/sans variants			Nombre de variants identifiés					
	Patient(s) sans variant	Patient(s) avec variant(s) B, PB ou VSI	Patient(s) avec variant(s) PP ou P	B	PB	VSI	PP	P	Total
DSD 46,XY									
1. Anomalies du développement gonadique	3	9	3	1	1	25	0	3	30
2. Syndrome de persistance des canaux müllériens	0	0	1	0	1	0	0	1	2
3. Autres types de DSD	11	25	31	3	2	87	24	14	130
4. DSD syndromiques	4	8	27	4	1	51	16	23	95
Total	18	42	62	8	5	163	40	41	257
DSD 46,XX									
1. DSD ovotesticulaire	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2. DSD testiculaire	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Total global	21	42	62	8	5	163	40	41	257

B : bénin, **P** : pathogène, **PB** : probablement bénin, **PP** : probablement pathogène, **VSI** : variant de signification indéterminée

Après l'analyse des 195 exomes, un total de 208 variants déterminés (soit 257 variants avec répétitions entre les patients) dans 84 gènes a été révélé dans ce travail. Les 68 variants (soit 81 variants avec répétition entre les patients) pathogènes et probablement pathogènes, considérés comme cliniquement significatifs, ont été mis en évidence dans 42 gènes chez 49,6% (62/125) de l'effectif (Figure 17).

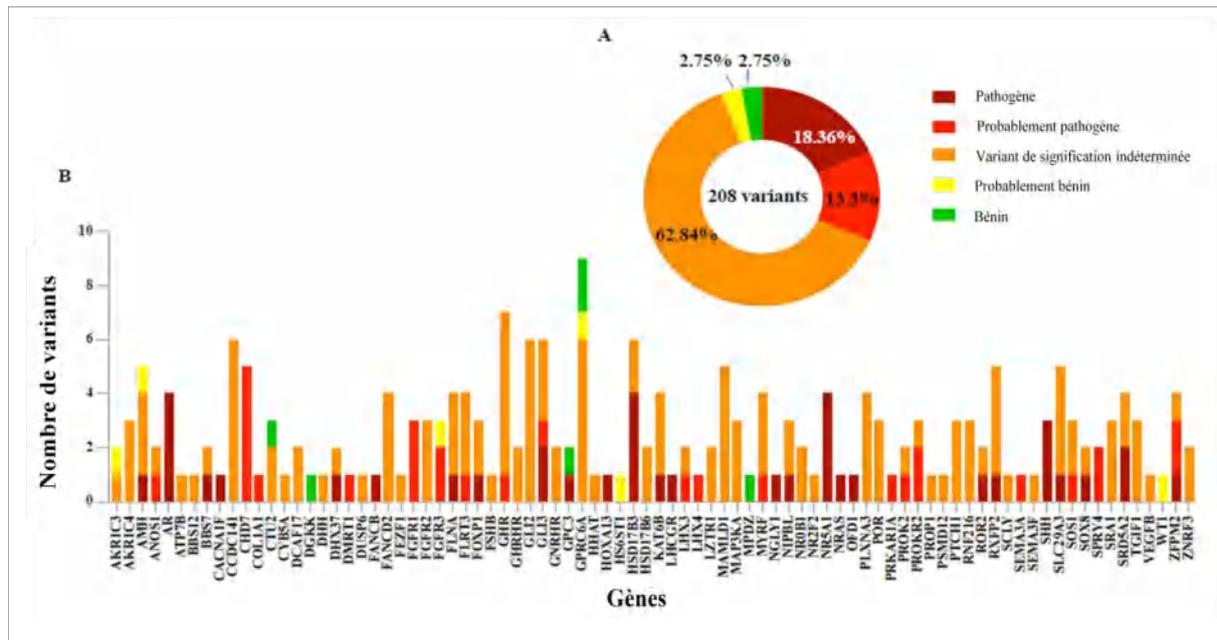


Figure 17. Distribution et classification des variants identifiés en fonction des 5 niveaux de pathogénicité dans 84 gènes

- (A) Résumé des proportions des 208 variants selon les diverses proportions de pathogénicité
 (B) Nombre et pathogénicité des variants identifiés dans 84 gènes liés aux divers phénotypes de DSD syndromiques/non syndromiques ainsi que les phénotypes somatiques illustrés dans la cohorte

Le rendement diagnostique global est similaire à celui enregistré récemment dans d'autres grandes populations utilisant l'approche NGS, suggérant que cette technologie est une méthode efficace pour améliorer le taux de diagnostic moléculaire chez les patients présentant un DSD.

En 2020, Abualsaud *et al.* ont enregistré une cause génétique englobant 42 gènes chez 51% d'une cohorte de 149 cas de DSD, en utilisant un panel de gènes liés aux DSD. Par ailleurs, Xu *et al.* (2019) ont noté un rendement diagnostique de 46,9% des 96 patients DSD 46,XY et de 10,3% des 29 patients DSD 46,XX impliquant 28 gènes, tandis que les échantillons d'ADN sélectionnés sans causes moléculaires ont été ré-analysés par le WES et le rendement n'a pas amélioré le taux de diagnostic. De même, en utilisant un panel de gènes DSD, Eggers *et al.* (2016), ont identifié un diagnostic génétique probable chez 43% des patients d'une cohorte de 278 individus DSD 46,XY, englobant 28 gènes.

3.1 Gènes prédominants dans la cohorte

Au total, 6 gènes avec des variants causaux ont été révélés comme étant prédominant chez 28 patients, soit 22,4% de la cohorte, dont 4 gènes sont liés aux DSD et 2 gènes sont liés à l'HHC (l'hypogonadisme hypogonadotrope congénital), décrit ci-après.

3.1.1 Gènes liés aux DSD

3.1.1.1 *HSD17B3*

Parmi les 62 patients de notre population, 5 garçons hypovirilisés (patients 20, 38, 50, 78 et 93) sont porteurs de 4 variants pathogènes nouveaux (p.T159N et p.T227A) ou rares (p.M47V et p.E214G), à l'état homozygote, du gène *HSD17B3*. Ce dernier est localisé sur le chromosome 9 (9q22.32) et code pour l'enzyme HSD17B3 dans les cellules de Leydig des testicules fœtales et adultes. En catalysant le substrat $\Delta 4A$ ($\Delta 4$ androsténédione) en testostérone, cette enzyme entraîne la masculinisation des OGI (canaux de Wolff, vésicules séminales et canaux déférents) pendant la vie fœtale et le développement des caractéristiques sexuelles masculines secondaires à la puberté (Luu-The *et al.*, 1990 ; Geissler *et al.*, 1994 ; George *et al.*, 2010).

La déficience en HSD17B3 (OMIM 264300) est une anomalie autosomique récessive rare qui résulte d'un défaut dans la dernière étape de biosynthèse de la testostérone dans le testicule fœtal, induisant ainsi une hypovirilisation des OGI et OGE en raison d'une faible production de la testostérone. Les enfants 46,XY atteints, manifestent des OGE variables allant du phénotype féminin complet ou ambigu au phénotype masculin prédominant qui présentent généralement un micropénis, une cryptorchidie et un hypospadias, tel est le cas pour nos 5 patients. Les OGI sont également variables et peuvent être hypoplasiques ou normaux (Andersson *et al.*, 1996 ; George *et al.*, 2010 ; Castro *et al.*, 2012).

À notre connaissance, un total de 52 variants pathogènes faux sens, par décalage du cadre de lecture ou altérant le site d'épissage, dans le gène *HSD17B3*, ont été identifiés chez 170 individus DSD 46,XY, conformément aux dernières constatations (Yang *et al.*, 2017 ; Lohiya *et al.*, 2019 ; Rafigh *et al.*, 2020 ; Alswailem *et al.*, 2021).

3.1.1.2 *SRD5A2*

Trois filles apparemment non-apparentées (patients 19, 34 et 57) et un garçon (patient 40) sont porteuses de 2 variants pathogènes et rares (p.G203S et p.Y235F) du gène *SRD5A2*, à l'état homozygote. Celui-ci code pour l'enzyme SRD5A2 qui est exprimé dans les tissus génitaux fœtaux pour catalyser la conversion de la testostérone en DHT. Cette dernière, est une hormone cruciale pour la croissance de la prostate et le développement des OGE chez les fœtus de sexe masculin au cours des premières semaines de vie *in utero* (Imperato-McGinley *et al.*, 1979 ; Alswailem *et al.*, 2019).

Les altérations du gène *SRD5A2*, localisé sur le chromosome 2 (2q23), sont considérées comme la cause d'une grande partie des cas de DSD 46,XY (Akçay *et al.*, 2014). Le diagnostic du déficit en *SRD5A2* (OMIM 264600) chez les jeunes enfants, et plus particulièrement chez les individus prépubères et les nouveau-nés atteints de DSD 46,XY, est difficile à définir en raison de la grande variation des caractéristiques phénotypiques d'un côté et de la similarité aux divers phénotypes causés par un déficit en *HSD17B3*, d'un autre côté (Walter *et al.*, 2010 ; Omrani *et al.*, 2011 ; Okeigwe *et al.*, 2014).

Les données de ces 9 individus porteurs de variants bialléliques pathogènes des gènes *HSD17B3* et *SRD5A2*, reflètent que la consanguinité peut contribuer à un rendement diagnostique plus élevé dans les cas de DSD, notamment que 6 de ces individus (patients 19, 38, 40, 50, 57 et 93) sont issus de mariages consanguins.

Une étude récente a noté une prévalence élevée des troubles autosomiques récessifs, du déficit en *HSD17B3* et en *SRD5A2* probablement due au taux élevé de consanguinité dans la population égyptienne, soit 53%, avec une élévation particulière chez les patients DSD 46,XY, atteignant les 70% (Mazen *et al.*, 2021).

De même, un taux élevé de déficience en *HSD17B3* (1:100-300) a été identifié dans la bande de Gaza, indiquant le rôle pertinent de la consanguinité dans l'augmentation de la prévalence de la déficience en *HSD17B3* (Rosler, 2006). Une augmentation de la prévalence des causes héréditaires de DSD a également été signalée en Inde en raison de la fréquence élevée des mariages consanguins (Nagaraja *et al.*, 2019).

3.1.1.3 *NR5A1*

Parmi nos patients, 4 (patients 5, 72, 86 et 87) sont porteurs de variants pathogènes nouveaux (p.R69L, W302R et p.H408P) ou rares (p.A351V), à l'état hétérozygote, du gène *NR5A1*. Trois de ces patients (patients 5, 86 et 87) ont été diagnostiqués avec une DG dont 2 (patients 86 et 87) présentent des anomalies rénales. Par manque de données cliniques, le patient 72 a été classé dans la catégorie « Autres types de DSD 46,XY ».

Ce n'est qu'en 1999 qu'Achermann *et al.* ont identifié le premier variant pathogène hétérozygote du gène *NR5A1* chez un patient présentant un phénotype de DG 46,XY avec des structures müllériennes (tel est le cas pour le patient 5) et une insuffisance surrénale primaire. Ces dernières années, les variants causaux de ce gène présentent une expressivité

phénotypique variable, une pénétrance incomplète et sont largement caractérisés dans le DSD 46,XY, l'insuffisance ovarienne prématurée (IOP) et les DSD T/OT 46,XX (Camats *et al.*, 2012 ; Eggers *et al.*, 2016 ; Knarston *et al.*, 2019).

3.1.1.4 AR

Dans notre population, trois filles (patientes 43, 63 et 98) et un garçon (patient 106) sont porteurs de 4 nouveaux variants pathogènes (p.G590W, p.N611K, p.M746V et p.R841G) du gène *AR* qui est localisé sur le chromosome 12 (Xq12) et code pour le récepteur des androgènes. Celui-ci est également connu sous le nom de récepteur de la DHT en raison de sa grande affinité à l'hormone DHT (Imperato-McGinley *et al.*, 1974 ; Migeon *et al.*, 1981 ; Brown *et al.*, 1989).

L'action de la testostérone et du DHT, par l'intermédiaire du récepteur d'androgènes est essentielle pour le développement sexuel masculin avant la naissance et pour le développement sexuel masculin secondaire à la puberté, tandis que chez les femmes, les androgènes participent au développement sexuel à la puberté et à l'âge adulte (Audi *et al.*, 2010). Le nombre des variants pathogènes du gène *AR* dépassant les 600 variants en 2010, s'élève progressivement avec un large spectre phénotypique allant de l'hypospadias isolé au phénotype féminin complet chez les individus 46,XY (Audi *et al.*, 2010 ; Hornig *et al.*, 2016 ; Jiang *et al.*, 2020).

La prédominance des 4 gènes (*HSD17B3*, *SRD5A2*, *NR5A1* et *AR*) liés aux diverses catégories de DSD 46,XY dans notre effectif, est similaire à celle publiée par Wang *et al.* (2018), indiquant que les variants des gènes *NR5A1*, *SRD5A2* et *AR*, sont les plus courants dans une cohorte de 70 patients DSD 46,XY et représentent respectivement 15,04%, 8,84% et 7,96% des variants. Par ailleurs, le séquençage d'ADN de 89 patients égyptiens par la méthode de Sanger a révélé une prédominance des gènes *SRD5A2* (6 variants), *HSD17B3* (8 variants), *AR* (5 variants) et *WT1* (2 variants) chez 14,6%, 11,2%, 5,6% et 2,2% des patients, respectivement (Mazen *et al.*, 2021).

3.1.2 Gènes liés à l'HHC

L'HHC est une condition génétique rare due à une sécrétion insuffisante de l'hormone de libération gonadotrope GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*) par l'axe hypothalamique ou à une défaillance de la sécrétion hypophysaire des gonadotrophines FSH/LH (Stamou et Georgopoulos, 2018).

Notre analyse a permis d'identifier 5 variants, nouveaux (p.C1101R) ou rares (p.V344I, p.P566A, p.G2330A, p.L2806V) à l'état hétérozygote et probablement pathogènes dans le gène *CHD7* situé sur le chromosome 8 (8q12.2), chez 7 individus (patients 25, 41, 45, 62, 75, 97 et 112). En outre, 2 variants rares (p.R85C et p.P290S) et probablement pathogènes ont été mis en évidence dans le gène *PROKR2*, localisé sur le chromosome 20 (20p12.3) chez 8 patients probablement non apparentés (patients 29, 45, 57, 62, 66, 67, 87, 102). Ces résultats sont discutés ci-dessous (Page 64).

3.1.3 Gènes liés aux phénotypes somatiques

Fait intéressant, il a été révélé dans cette étude que 2 sujets (patients 101 et 104) sont porteurs de variants expliquant le phénotype somatique mais non liés au phénotype DSD. Par ailleurs, chez un autre sujet (patient 93), 2 variants ont été mis en évidence dont un expliquant le phénotype DSD et l'autre le phénotype somatique.

3.1.3.1 *NGLY1*

Un variant homozygote non-sens (p.W244X) a été identifié, chez un patient (patient 104) issu de parents consanguins, dans le gène *NGLY1* (*N-glycanase 1*) situé sur le chromosome 3 (3p24.2) et codant pour l'enzyme NGLY1, dont la déficience provoque un trouble congénital sévère autosomique récessif de la déglycosylation (Freez, 2013). Le phénotype somatique de ce patient se caractérise par un front étroit, des crises épileptiques, un hirsutisme, une quadriparésie, une légère hépatomégalie et une atrophie corticale, ce qui est largement expliqué par le variant du *NGLY1*. L'analyse de l'ensemble des données de l'exome n'a pas révélé d'autres variants connus pour être associées à un DSD syndromique ou non syndromique chez ce patient, avec un micropénis enfui (<0,5cm), des bourrelets génitaux féminins et une cryptorchidie bilatérale, mais cela n'exclut pas la possibilité que le gène *NGLY1* puisse être un candidat aux DSD.

3.1.3.2 *CACNA1F*

Chez le second patient (patient 101), un nouveau variant hémizygotique faux-sens (p.L1454V) a été révélé dans le gène *CACNA1F* (*calcium channel, voltage-dependent, alpha-1F subunit*) situé sur le chromosome X (Xp11.23) et codant pour une enzyme régulatrice de l'entrée d'ions de calcium du milieu extracellulaire vers le cytoplasme des cellules de la rétine. Ce mécanisme est nécessaire pour la libération tonique de glutamate par la couche des photorécepteurs (bâtonnets et cônes) (Yang *et al.*, 1993).

Environ 260 variants du gène *CACNA1F* sont liés à la maladie ophtalmique des îles Åland et la cécité nocturne stationnaire congénitale incomplète. Ces deux troubles sont caractérisés par un nystagmus, un défaut de vision des couleurs, une myopie et d'autres anomalies de la rétine (Mahmood *et al.*, 2021).

Le phénotype somatique du patient 101 se caractérise par un retard staturo-pondéral, une hernie inguinale, une myopie et un strabisme. Ces deux dernières anomalies sont expliquées par le variant du gène *CACNA1F*. L'analyse de l'ensemble des données de l'exome n'a pas révélé d'autres variants connus pour être associées à un DSD syndromique ou non syndromique chez ce patient, présentant des bourrelets génitaux hypoplasiques et une cryptorchidie bilatérale.

3.1.3.3 *COL1A1*

Un individu 46,XY syndromique (patient 93) est porteur d'un nouveau variant (p.P247S) du gène *HSD17B3* (préalablement décrit) expliquant le phénotype DSD et d'un variant du gène *COL1A1* susceptible de causer le phénotype somatique. Ce patient a été suspecté avec un phénotype syndromique, comprenant un DSD (micropénis, hypospadias pénoscrotal, bourrelets génitaux féminins fusionnés et une cryptorchidie bilatérale), un visage triangulaire, des bosses frontales, des sclérotiques bleues, un nez en forme de selle, des oreilles décollées, un nanisme des membres courts, une déformation de la paroi thoracique, une dysplasie congénitale de la hanche de type III, un microadénome hypophysaire, une anémie ferriprive et un faible poids à la naissance (1900g). À l'âge de 4 ans et 7 mois, son poids était de 10 kg (-4 DS ; déviations standards) et sa taille de 77 cm (<-6 DS).

L'analyse de l'ensemble des données de l'exome par corrélation phénotype-génotype a permis d'identifier un variant hétérozygote (p.P247S) et probablement pathogène du gène *COL1A1* (*collagen type I alpha 1 chain*), absent de toutes les bases de données SNP publiques. Ce gène, situé sur le chromosome 17 (17q21.33), code pour la protéine COL1A1, dont les variants décrits sont associés à un trouble génétique rare autosomique dominant du tissu conjonctif "ostéogenèse imparfaite de type III" (OMIM 259420). Celui-ci, est caractérisé par un visage triangulaire, un bossage frontal, une stature très courte, des déformations des os longs et de multiples problèmes vertébraux (Van Dijk et Sillence, 2014 ; Maioli *et al.*, 2019).

3.2 Etiologie moléculaire indéterminée

Malgré le travail de recherche mené en séquençage et phénotypage, l'étiologie moléculaire n'a pu être établie chez 63 individus dont 42 patients, soit 33,6% de la cohorte, sont porteurs de variants bénins, probablement bénins ou de signification indéterminée impliquant 41 gènes. Chez 16,8% (21 individus) de la population englobant les trois patients présentant les phénotypes DSD 46,XX et 18 individus atteints de DSD 46,XY, aucun variant n'a été identifié de nos jours.

De manière globale, le rendement diagnostique varie entre les 4 catégories de DSD 46,XY et, est plus élevé dans la catégorie des cas de DSD syndromiques, où 69,2% (27/39) des patients sont porteurs de variants pathogènes ou probablement pathogènes et 20,5% (8/39) sont porteurs de variants bénins, probablement bénins ou de signification indéterminée.

En revanche, le rendement diagnostique est noté dans seulement 20% (3/15) de la catégorie des sujets initialement définie avec des anomalies du développement gonadique, tandis que chez 60% (9/15) de cette catégorie des variants bénins, probablement bénins ou de signification indéterminée ont été identifiés. Par ailleurs, chez 46,3% (31/67) des patients classés dans la catégorie «autres types de DSD 46,XY», des variants pathogènes/probablement pathogènes sont rapportés et les variants bénins, probablement bénins ou de signification indéterminée sont mis en évidence chez 37,3% (25/67) de cette série (Tableau 6).

3.3 Diagnostic moléculaire chez les patients séquencés avec ou sans parent(s)

Dans le cadre d'une restriction des données cliniques dans les cas de DSD, la question du séquençage de l'échantillon d'ADN du patient seul ou avec celui de ses parents est importante pour un diagnostic moléculaire plus précis. En outre, au cours de cette étude, les parents (avec ou sans fratrie) de 51 patients porteurs de variants potentiels impliquant certains gènes ont été testés par le séquençage Sanger, afin de déterminer leur transmission (Tableau 7).

Tableau 7. Résumé de l'ensemble des échantillons d'ADN séquencés pour un nombre de variants testés

Cohorte	Echantillons d'ADN séquencés				Nombre des variants testés			
	Patient(s) en duo	Patient(s) en trio	Partient(s) en trio avec fratrie	Total	Patient(s) en duo	Patient(s) en trio	Partient(s) en trio avec fratrie	Total
DSD 46,XY								
1. Anomalies du développement gonadique	2	3	1	6	4	7	2	13
2. Syndrome de persistance des canaux müllériens	0	1	0	1	0	1	0	1
3. Autres types de DSD	1	10	6	17	2	18	10	30
4. DSD syndromiques	4	9	4	17	6	14	10	30
Total	7	23	11	41	12	40	22	74
DSD 46,XX								
1. DSD ovotesticulaire	0	0	0	0	0	0	0	0
2. DSD testiculaire	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0
Total global	7	23	11	51	12	40	22	74

Patient en solo : uniquement l'individu atteint, **patient en duos** : l'individu atteint et un parent, **patient en trios** : l'individu atteint et ses deux parents, **patient en trios avec fratrie** : l'individu atteint, ses deux parents avec au minimum un frère ou une sœur

Il s'est avéré que le rendement diagnostique chez les individus dont au moins un ADN parental est testé, est similaire à celui des individus dont l'ADN parental n'est pas disponible pour cette étude, soit 56,1% (23/41) contre 59,7% (37/62), respectivement. Les variants sont classés comme bénins, probablement bénins ou de signification indéterminée chez 43,9% (18/41) des patients où l'ADN des parents a été testé par rapport aux patients séquencés sans l'ADN parental, 40,3% (25/62). Cela suggère que le test des parents peut aider à établir un diagnostic génétique précis en classant les variants comme bénins, probablement bénins ou de signification indéterminée plutôt que pathogènes ou probablement pathogènes.

Dans une étude utilisant un panel de gènes liés au DSD, menée par Eggers *et al.* (2016) et concernant 326 patients atteints de DSD, dont 251 ont été séquencés sans l'ADN parental et 75 ont été séquencés avec des membres de leur famille, le diagnostic génétique est noté chez 41% des patients séquencés avec leurs deux parents et chez 43% des patients séquencés seuls. En revanche, une proportion plus élevée de patients séquencés seuls présente des VSI (17%) par rapport aux patients séquencés avec leurs deux parents (8%).

3.4 Détermination des variants de gènes liés à l'HHC dans les phénotypes de DSD 46,XY

De manière intéressante, 43 variants géniques sont mis en évidence dans 20 gènes (*ANOS1*, *CCDC141*, *CHD7*, *DUSP6*, *FEZF1*, *FGFR1*, *FLRT3*, *FSHB*, *GNRHR*, *HS6ST1*, *LHX3*, *LHX4*, *PLXNA3*, *PROK2*, *PROKR2*, *PROPI1*, *RNF216*, *SEMA3A*, *SEME3F* et *SPRY4*) associés à l'HHC. Ces variants identifiés chez 39,2% (49/125) de la population étudiée, parmi lesquels, 18 variants impliquant les gènes *ANOS1*, *CHD7*, *FGFR1*, *FLRT3*, *LHX3*,

LHX4, *PROK2*, *PROKR2*, *SEMA3A* et *SPRY4* sont classés comme étant pathogènes ou probablement pathogènes chez 17,6 % (23/125) de la cohorte.

Contrairement à nos résultats, Eggers *et al.* (2016) ont signalé des variants dans seulement sept gènes (*CHD7*, *KALI*, *WDR11*, *PROK2*, *PROKR2*, *FGF8* et *FGFR1*) connus pour causer l'HHC chez 5,5% (18/326) des patients atteints de DSD.

3.5 Identification de variants causaux, communs entre les patients

Plusieurs variants potentiellement pathogènes ou probablement pathogènes sont observés chez plus qu'un individu affecté (Tableau 8).

Tableau 8. Distributions des variants des gènes présents chez plus d'un individu

Gène	variant	Nombre de patients porteurs	Signification clinique du variant (ACMG)	Référence/Classification
<i>PROKR2</i>	p.R85C	6	PP	McCormack <i>et al.</i> , 2017/ P
	p.P290S	2	PP	Cox <i>et al.</i> , 2018/ VSI
<i>CHD7</i>	p.L2806V	3	PP	Alkelai <i>et al.</i> , 2017/ VSI
<i>SRD5A2</i>	p.Y235F	3	P	Parlak <i>et al.</i> , 2014/ P
<i>HSD17B3</i>	p.R308Q	2	P	
<i>DHX37</i>	p.T159N	2	P	McElreavey <i>et al.</i> , 2020/ P

P : pathogénique, **PP** : probablement pathogénique

3.5.1 PROKR2

Deux changements dans la protéine PROKR2 ont été mis en évidence, dont la première substitution (p.R85C), rapportée par McCormack *et al.* (2017) comme étant un variant pathogène, a été identifiée dans notre échantillon comme étant un variant probablement pathogène chez 4 individus non apparentés (patients 29, 62, 87 et 102) ainsi que chez 2 frères (patients 66 et 67), présentant des OGE atypiques et élevés garçons. Chez un de ces 6 individus (patient 29), le variant est rapporté « *de novo* » et chez les 5 autres individus, la transmission parentale est inconnue.

La seconde substitution (p.P290S) de la même protéine a été signalée dans la littérature comme étant un VSI (Cox *et al.*, 2018) et probablement pathogène chez 2 patients non apparentés (patients 45 et 57), diagnostiqués avec des troubles de synthèse/action des androgènes ou un déficit en *SRD5A2*. Chez un patient (patient 45) élevé garçon, ce variant est hérité de la mère et chez le second (patient 57), qui est élevé fille, la transmission n'a pu être déterminée.

3.5.2 CHD7

Un autre variant (p.L2806V) de la protéine CHD7, publié par Alkelai *et al.* (2017) comme étant un VSI, a été mis en évidence dans cette étude comme étant un variant probablement pathogène chez 3 patients non apparentés (patients 41, 45 et 62) classés dans la catégorie «autres types de DSD 46,XY» et élevés garçons. Par ailleurs, un variant (p.M1312R) de la protéine GLI3 est identifié chez 2 garçons non apparentés (patients 107 et 113) et a été hérité du père chez un patient (patient 113). Ce variant n'a pas été rapporté dans la littérature et il est considéré comme probablement pathogène.

3.5.3 SRD5A2

L'analyse WES a également révélé un variant rare et pathogène (p.Y235F) au niveau de la protéine SRD5A2, précédemment rapporté dans la littérature par Parlak *et al.* (2014) comme étant pathogène. Le variant déjà mentionné, a été identifié à l'état homozygote chez 3 individus apparemment non apparentés (patients 19, 34 et 57) manifestant des troubles de synthèse/action d'androgènes, élevés filles.

3.5.4 DHX37

Un variant (p.R308Q) de la protéine DHX37, préalablement déterminé par McElreavey *et al.* (2020) comme étant pathogène, a été identifié chez 2 garçons présentant le syndrome de régression testiculaire. Etant pathogène, ce variant a été retrouvé «*de novo*» chez le premier patient (patient 6) et transmis par la mère chez le deuxième patient (patient 8) (Zidoune *et al.*, 2021).

3.5.5 HSD17B3

Cette étude montre la présence du dernier variant commun, retrouvé à l'état homozygote, chez 2 patients (patients 78 et 93), dont un (patient 93) est issu d'un mariage consanguin. Ces patients présentant des OGE atypiques et élevés garçons, sont probablement non apparentés, mais issus d'un isolat géographique de la région de Skikda. Il s'agit d'une nouvelle substitution (p.T159N) pathogène, touchant la protéine HSD17B3. Cela suggère que ce variant se situe dans un point chaud mutationnel ou qu'il en résulte d'un effet fondateur, notamment que les parents sont des porteurs obligatoires.

3.6 Identification de plus qu'un variant causal pour le même patient

L'hypothèse indiquant que les causes digéniques ou multigéniques sont vraisemblablement répandues dans les cas des DSD, a été suggérée dans cette investigation suite à la révélation de 14 patients porteurs d'un variant pathogène ou probablement pathogène dans plus qu'un gène connu pour être associé au DSD (*ANOS1*, *AR*, *BBS7*, *CHD7*, *FGFR1*, *FGFR3*, *FLNA*, *GPC3*, *HOXA13*, *KAT6B*, *LHCG*, *LHX3*, *NR5A1*, *NRAS*, *OFD1*, *PRKARIA*, *PROK2*, *PROKR2*, *RXFP2*, *SEMA3A*, *SHH* et *SRD5A2*), soit chez 11,2 % de l'ensemble de la cohorte. Il s'agit de 8 cas (patients 86, 87, 98, 100, 102, 109, 118 et 122) présentant les phénotypes de DSD syndromiques 46,XY et 6 cas (patients 25, 45, 49, 57, 62 et 74) avec les phénotypes de DSD non syndromiques 46,XY de la catégorie «autres types de DSD 46,XY».

Les causes digéniques dans les DSD ont été préalablement mises en évidence dans la littérature. Mazen *et al.* (2016) ont révélé par le WES la présence de variants hétérozygotes, pathogènes et *de novo* du gène *NR5A1* chez 2 patients égyptiens non apparentés, présentant une dysgénésie gonadique. Un de ces patients est porteur d'un variant supplémentaire impliquant le gène *MAP3K1* pouvant expliquer la sévérité de son phénotype par rapport au patient porteur du variant du gène *NR5A1*. Cela suggère que la combinaison du variant du gène *NR5A1* avec un variant du gène *MAP3K1* peut influencer la variabilité phénotypique du DSD.

3.7 Nouveaux variants génétiques associés aux DSD

Au cours de cette étude, seulement 26% (54/208) de l'ensemble des variants identifiés dans les gènes liés au DSD ont préalablement été publiés dans la littérature (Figure 18).

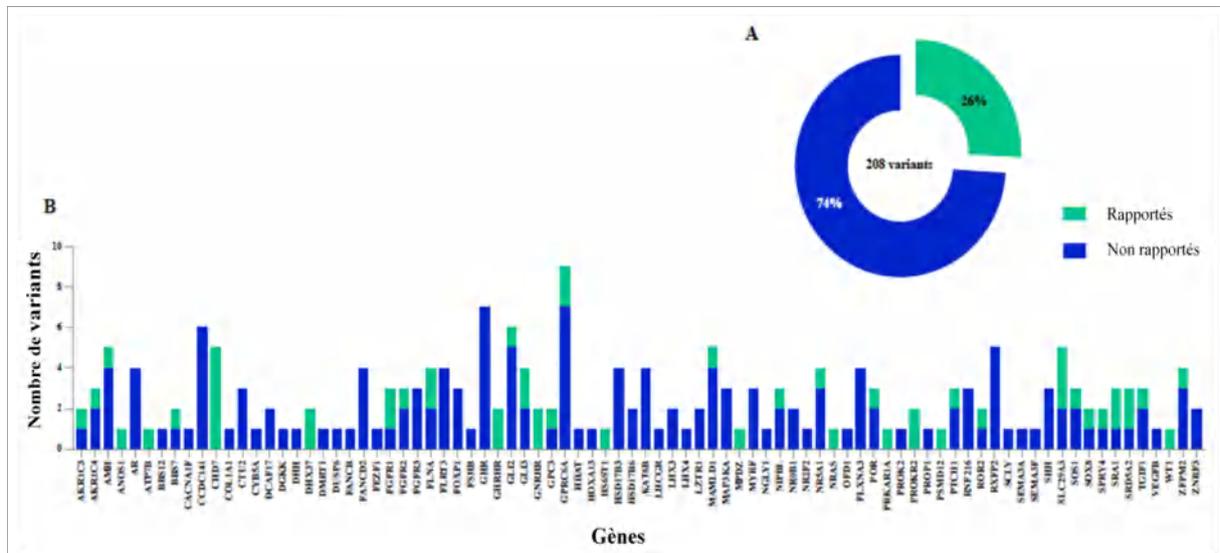


Figure 18. Distribution des variants précédemment rapportés et non rapportés dans la littérature

(A) Proportions globales des 208 variants rapportés et non rapportés dans la littérature.

(B) Distribution de l'ensemble de variants identifiés dans les 84 gènes liés aux divers phénotypes de DSD syndromiques/non syndromiques ainsi que les phénotypes somatiques illustrés dans la cohorte. Le nombre total de variants rapportés et non rapportés dans la littérature est indiqué pour chaque gène.

Parmi les 54 variants, 22 ont déjà été classés comme pathogènes ou probablement pathogènes dans les gènes *ANOS1*, *CHD7*, *DHX37*, *FGFR1*, *FLNA*, *GLI3*, *NR5A1*, *NRAS*, *PRKARIA*, *PROKR2*, *SLC29A3*, *SOS1*, *SPRY4*, *SRD5A2* et *ZFPM2*, chez 27 patients, soit 21,6% de l'effectif.

Par ailleurs, 74% (154/208) des variants n'ont pas été signalés précédemment dans la littérature. Parmi ceux-ci, 30 ont été classés comme pathogènes ou probablement pathogènes chez 22,4% (28/125) des patients avec un total de 25 gènes différents, dont 6 gènes portaient plus qu'un nouveau variant. Il s'agit des gènes *AR* (patients 43, 63, 98 et 106), *FGFR3* (patients 35, 49 et 121), *HSD17B3* (patients 20, 38, 50, 78 et 93), *NR5A1* (patients 5, 72 et 86), *SHH* (patients 49, 74 et 118) et *ZFPM2* (patients 64 et 91).

Dans une étude récente, 40,8% (31/76) des variants identifiés sont nouveaux dont les plus fréquents impliquent les gènes *AR* et *SRD5A2* (Xu *et al.*, 2019). En revanche, Kim *et al.* (2017) ont mis en évidence 4 nouveaux variants des gènes *AR*, *CYP17A1*, *CHD7* et *NR5A1*, classés comme pathogènes ou probablement pathogènes chez uniquement neuf patients parmi 44 cas de DSD, soit 20,5% de la population étudiée.

3.8 Identification des variants génétiques dans les DSD syndromiques et non syndromiques 46,XY

Globalement, les 68 variants mis en évidence dans notre population, ont été enregistrés dans des gènes expliquant le phénotype DSD, la forme syndromique des DSD et/ou le phénotype somatique (Annexe 8).

3.9 Identification des VSI dans les DSD 46,XY

L'analyse des fichiers VCF a apporté des observations inédites suggérant de nouvelles causes génétiques probables du DSD 46,XY. Les variants cités ci-dessous, nécessitent des travaux plus poussés pour élucider leurs rôles, permettant ainsi, l'élargissement du spectre phénotypique associé aux gènes connus pour causer les DSD.

3.9.1 VSI dans le gène *NR2F2*

Le gène *NR2F2*, localisé sur le chromosome 15 (15q26.2), code pour le facteur de transcription COUP-TFII (*chicken ovalbumin promoter transcription factor II*), un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires stéroïdiens/thyroïdiens et structurellement apparenté au récepteur nucléaire NR5A1. Le facteur de transcription COUP-TFII joue un rôle majeur dans la transition mésenchymateuse-épithéliale. En modulant l'expression génique, ce facteur de transcription est impliqué dans le développement de multiples tissus et organes pour favoriser la prolifération, la migration, la différenciation et la survie des cellules ainsi que la communication intercellulaire (Pereira *et al.*, 1999 ; Polvani *et al.*, 2019).

Dans la littérature, des variants InDel, hétérozygotes et *de novo*, dans le gène *NR2F2*, ont récemment été rapportés en association avec une forme syndromique rare de DSD 46,XX (*SRY* négatif). De manière plus explicite, ces variants de perte de fonction ont provoqué le développement testiculaire chez des patients 46,XX, diagnostiqués avec des OGE masculins atypiques, une cardiopathie congénitale ainsi que d'autres caractéristiques somatiques (Bashamboo *et al.*, 2018 ; Carvalheira *et al.*, 2019).

A ce jour, les variants *NR2F2* n'ont pas été identifiés en association avec le phénotype de DSD 46,XY, chez l'être humain. En revanche, chez les souris mâles XY, le récepteur COUP-TFII a été décrit par Kilcoyne *et al.* (2014) comme étant essentiel pour la différenciation et la fonction des cellules de Leydig fœtales et adultes. L'inactivation de ce récepteur pendant les stades prépubertaires du développement sexuel masculin entraîne l'infertilité, l'hypogonadisme et un blocage de la spermatogenèse en raison d'un défaut de maturation des cellules progénitrices des cellules de Leydig (Qin *et al.*, 2008).

Fait intéressant, chez un garçon diagnostiqué avec un DSD 46,XY non syndromique (patient 37), un nouveau variant faux-sens (p.R246H), *de novo*, se situant au sein du domaine de liaison au ligand, a été identifié. Ce variant, de signification indéterminée, est considéré comme délétère par SIFT (0,03), probablement dommageable par PolyPhen2 (0,988) et probablement pathogène selon le score REVEL (0,992).

Chez ce patient, présentant un micropénis avec un hypospadias médian et deux gonades palpables, la réponse à la stimulation par hCG est positive. L'association de ces données cliniques à de faibles niveaux de gonadotrophines, suggère un diagnostic probable d'HHC. De ce fait, des preuves génétiques et expérimentales supplémentaires sont nécessaires pour soutenir l'hypothèse de l'implication des variants du gène *NR2F2* dans l'HHC 46,XY et probablement dans les DSD 46,XY.

3.9.2 VSI identifiés chez des jumeaux monozygotes discordants pour le phénotype DSD

La recherche des différences dans la constitution génétique chez les jumeaux monozygotes discordants pour un phénotype donné, a été suggérée comme une approche prometteuse dans la mise en évidence de nouveaux gènes liés à plusieurs maladies ou anomalies congénitales. Une proportion minimale de variants *de novo* dans les troubles congénitaux monogéniques, discordants dans les paires de jumeaux monozygotes, a été publiée dans plusieurs travaux scientifiques (Kruyer *et al.*, 1994 ; Taylor *et al.*, 2008 ; Zwijnenburg *et al.*, 2010).

Nous avons réalisé un WES pour une famille de jumeaux monozygotes 46,XY discordants pour le phénotype DSD et issus d'un mariage consanguin. Un des jumeaux (patient 71) est diagnostiqué avec un micropénis courbé, associé à un hypospadias pénoscrotal et des testicules hypotrophiques non descendus, dont le testicule gauche est non palpable ; alors que son frère jumeau présente des organes génitaux masculins typiques.

Cette analyse est établie en supposant que les 2 frères peuvent soit partager des variants causant le phénotype mais l'un d'entre eux n'est pas affecté, soit le garçon affecté peut être porteur d'un variant pathogène *de novo* apparu au début du développement embryonnaire.

Conformément à ces hypothèses, le filtrage et la comparaison des fichiers VCF des 2 frères et leurs parents ont mis en évidence trois nouveaux variants distincts, absents de toutes les bases de données SNP publiques et de signification indéterminée, dans 3 gènes: *CDCC141*, *SCLY* et *VEGFB* (Figure 19).

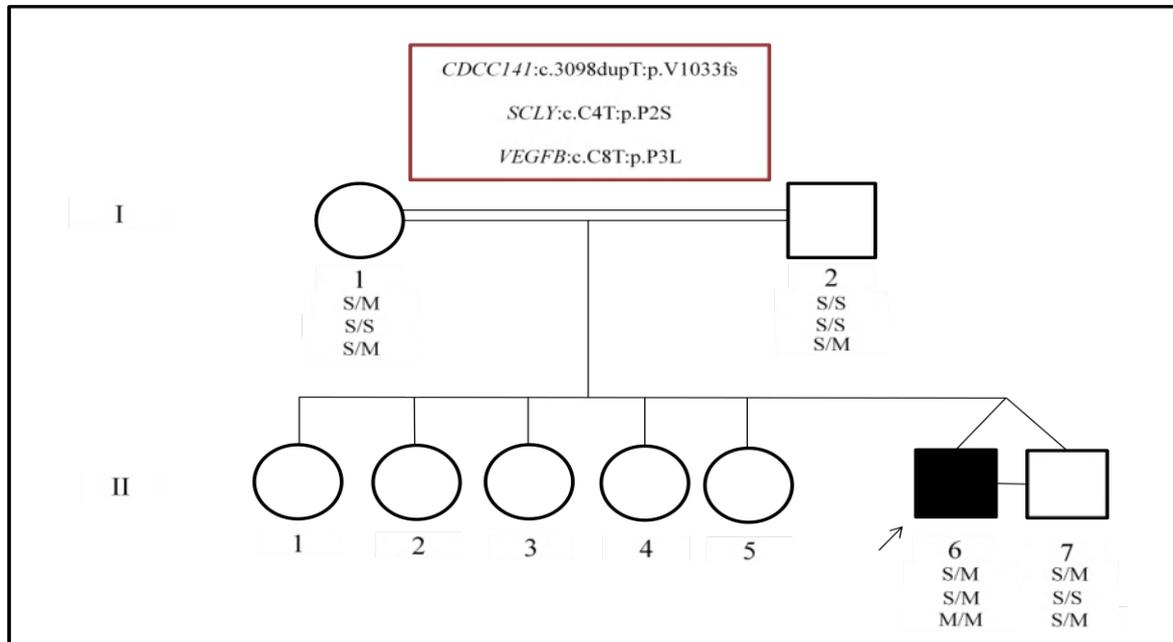


Figure 19. Pedigree et ségrégation représentatifs des 3 variants dans les gènes *CDCC141*, *SCLY* et *VEGFB* chez les 2 frères jumeaux monozygotes (patient 71 : II6 ; son frère : II7) ainsi que leurs parents (mère : I1 ; père : I2).

M : muté, **S** : sauvage

En effet, les deux frères sont porteurs d'un nouveau variant InDel (p.V1033fs), hétérozygote, transmis par la mère et qui devrait entraîner l'apparition d'une protéine *CCDC141* tronquée. Le gène *CCDC141* situé sur le chromosome 2 (2q31.2) et codant pour cette protéine, est exprimé au cours du développement embryonnaire dans les neurones à GnRH ainsi que dans les nerfs olfactifs (Hutchins *et al.*, 2016).

Malgré que dans la littérature, les variants mono/bialléliques de la *CCDC141* soient associés à l'HHC avec ou sans anosmie, et qu'une pénétrance incomplète associée à des variants tronquants du gène *CCDC141* a été décrite précédemment dans une large cohorte chinoise atteinte d'HHC (Turan *et al.*, 2017 ; Hou *et al.*, 2020), aucune preuve clinique n'a justifié un diagnostic d'HHC chez le patient d'intérêt. Par conséquent, ce variant a été classé comme un variant de signification indéterminée.

Dans cette étude, un nouveau variant faux-sens (p.P3L), de signification indéterminée est décrit dans le gène *VEGFB* à l'état homozygote chez le patient, et à l'état hétérozygote chez son frère non affecté et ses deux parents.

Bien que le gène *VEGFB*, localisé sur le chromosome 11 (11q13.1), code pour le facteur de croissance *VEGFB* (*vascular endothelial growth factor B*) qui joue un rôle clé dans la régulation de la formation des vaisseaux sanguins, le ciblage endothélial des lipides vers les tissus périphériques et l'apoptose *via* le récepteur endothélial *VEGFR1* (*vascular endothelial growth factor receptor 1*). Actuellement, il n'y a aucune preuve indiquant un éventuel rôle direct de la protéine *VEGFB* dans la détermination/différenciation gonadique humaine et très peu d'informations ont été publiées dans la littérature concernant la régulation du développement vasculaire dans les gonades et l'angiogenèse nécessaire au déplacement de la testostérone vers le système reproducteur masculin en développement (Brennan *et al.*, 2002 ; Hagberg *et al.*, 2010, Lal *et al.*, 2018).

De ce fait, il est nécessaire de prendre en compte l'implication du mécanisme moléculaire de la régulation (expression/action) du gène *VEGFB* dans le développement vasculaire dans le testicule, notamment que Sargent *et al.* (2015) ont suggéré que ce gène pourrait être l'un des candidats potentiels pour initier le développement vasculaire spécifique au sexe en l'absence du gène *VEGFA* qui est connu pour être impliqué dans ce processus et dans la formation du cordon séminifère.

Par ailleurs, le frère affecté est également porteur d'un nouveau variant (p.P2S) hétérozygote, retrouvé *de novo* dans le gène *SCLY* et absent chez le frère jumeau. Ce gène, situé sur le chromosome 2 (2q37.3), code pour la sélénocystéine lyase (*SCLY*), une enzyme dépendante du pyridoxal 5'-phosphate qui catalyse spécifiquement la décomposition de la L-sélénocystéine en L-alanine et en sélénium élémentaire (Mihara *et al.*, 2000).

L'équipe de Seale *et al.* (2018) a montré que chez la souris, la protéine *SCLY* est exprimée dans les cellules de Leydig et que le sélénium agit directement sur la production de testostérone. A notre connaissance, aucune corrélation significative entre le gène *SCLY* et le phénotype DSD n'a été mise en évidence chez l'humain à ce jour. De ce fait, la substitution faux-sens p.P2S est classée comme étant de signification indéterminée.

De plus, un cas indépendant de DSD (patient 60), présentant un micropénis et une cryptorchidie bilatérale, avec un diagnostic génétique indéterminé, est porteur d'un variant faux-sens hétérozygote (p.D154N) du gène *SCLY*. Ce variant de signification indéterminée, est considéré comme probablement responsable de la pathologie selon le score REVEL (0,579). Cependant, les ADN des parents de cet enfant n'ont pas été disponibles pour l'étude. De ce fait, les 2 variants du gène *SCLY* identifiés dans notre cohorte peuvent contribuer au phénotype, mais sans autre preuve génétique ou expérimentale.

3.10 Cas familiaux de DSD 46,XY

Les familles atteintes de DSD sont considérées comme exceptionnellement rares. En revanche, il a été stipulé dans la littérature que de nombreux cas de DSD peuvent être familiaux plutôt que sporadiques, car le phénotype peut parfois être si léger chez un individu, que le clinicien ne peut le diagnostiquer jusqu'à ce qu'un membre de la même famille plus significativement atteint consulte un médecin. Cette expression variable des phénotypes cliniques ainsi qu'une pénétrance incomplète entre les membres de la famille porteurs du même variant pathogène sont signalées dans les travaux précédents (Sarafoglou et Ostrer, 2000 ; Brauner *et al.*, 2016).

Par conséquent, des études de liaison concernant les cas familiaux de DSD devraient aider à élargir le spectre phénotypique et à identifier de nouveaux gènes déterminant le sexe en utilisant l'approche NGS, en particulier le WES. Celui-ci favorise la détermination des modifications génétiques rares et pathogènes ainsi que leur pénétrance qui peut expliquer la variabilité phénotypique décrite dans les cas familiaux de DSD.

Dans la présente investigation, cinq familles non apparentées sont diagnostiquées avec une variabilité intrafamiliale dans l'expression de différents phénotypes de DSD. Parmi ces familles, trois présentent 8 variants géniques différents, dont 2 sont nouveaux et 6 sont rares, identifiés chez 8 individus affectés.

3.10.1 Première famille

Dans la première famille (patients 9 et 83), deux variants faux-sens de signification indéterminée ont été mis en évidence chez le patient 9 présentant une dysgénésie gonadique, hérités de son père (patient 83) présentant un hypospadias postérieur (Figure 20).

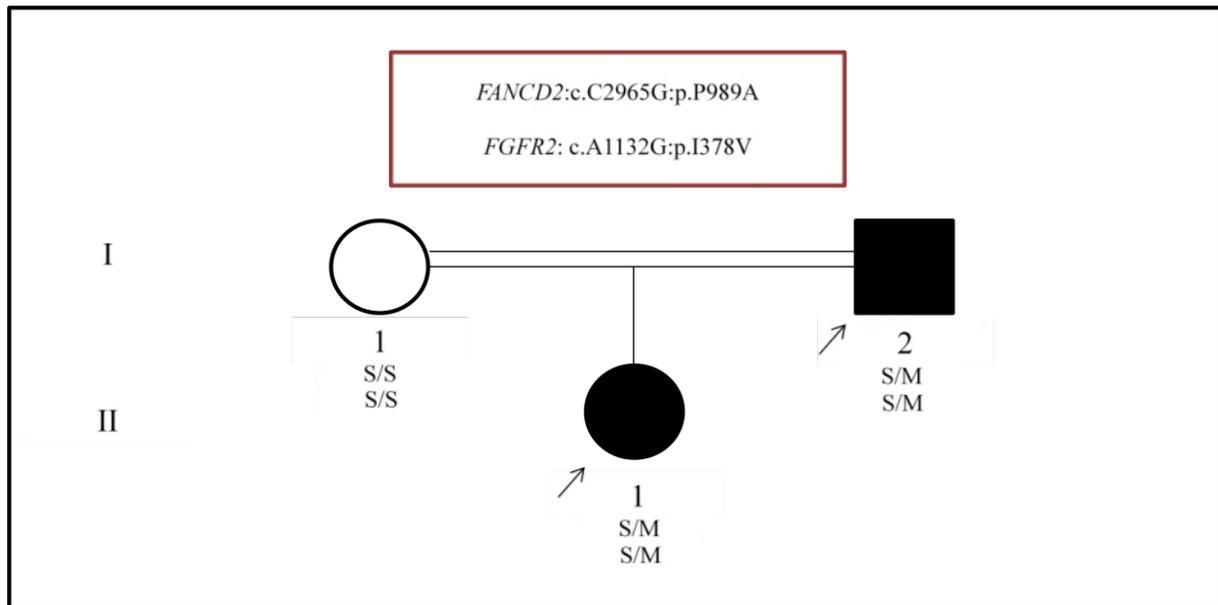


Figure 20. Pedigree et ségrégation représentatifs des 2 variants dans les gènes *FANCD2* et *FGFR2* chez le patient 9 (III1), son père (patient 83 : II2) et sa mère (II1).

M : muté, S : sauvage

Il s'agit du nouveau variant (p.I378V) du gène *FGFR2* (*fibroblast growth factor-receptor 2*), localisé sur le chromosome 10 (10q26.13). Ce gène code pour le facteur de croissance FGFR2, une tyrosine kinase dont le dysfonctionnement est lié à un certain nombre de troubles impliqués dans la structuration et la croissance osseuse (Azoury *et al.*, 2017).

Des études fonctionnelles récentes sur des modèles de souris ont démontré qu'au cours du développement de la gonade embryonnaire bi-potentielle, la délétion homozygote du gène *Fgfr2* entraîne une variété de phénotypes, notamment l'hypoplasie testiculaire et l'ovotestis. En revanche, chez l'humain, les pertes de copies ou des variants ponctuels d'un seul nucléotide à l'état hétérozygote du gène *FGFR2* nécessitent la présence d'un médiateur spécifique au DSD pour être classées comme étant des candidats de la détermination/différenciation sexuelle (Bagheri-Fam *et al.*, 2008 ; Hagan et Amarillo, 2017).

Le second variant (p.P989A) noté chez cette famille dans le gène *FANCD2* (*Fanconi anemia, complementation group D2*), est rare et également présent chez la patiente 34 diagnostiquée avec un SIPA et élevée fille. Ce gène, situé sur le chromosome 3 (3p25.3), code pour la protéine nucléaire FANCD2. Celle-ci est impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN et la protection contre les lésions induites par la ferroptose dans les cellules stromales de la moelle osseuse (Timmers *et al.*, 2001 ; Song *et al.*, 2016).

Selon la base de données «OMIM», les variants de cette protéine sont associés à une forme autosomique récessive d'anémie (OMIM 227646). En revanche, des études *in vivo* ont montré que les souris *FancD2*^{-/-} présentent un hypogonadisme avec une gamétogenèse altérée (Houghtaling *et al.*, 2003 ; Parmar *et al.*, 2009) . Une étude récente a mené une découverte inédite d'un variant à l'état homozygote dans le gène *FANCD2* chez un nourrisson saoudien diagnostiqué avec une forme syndromique de DSD (Al Jabri *et al.*, 2021). De ce fait, les variants des gènes *FANCD2* et *FGFR2* mis en évidence dans cette famille sont de signification indéterminée.

3.10.2 Deuxième famille

La deuxième famille (patients 66, 67 et 114,) est composée d'un patient atteint de DSD syndromique (patient 114) et de ses deux oncles maternels affectés (patients 66 et 67). Ces derniers présentent un micropénis, un hypospadias périnéal et une cryptorchidie unilatérale.

Au total, cinq variants mis en évidence peuvent contribuer aux phénotypes décrits dans cette famille, dont trois variants faux-sens ont été partagés par les deux frères (patients 66 et 67) dans les gènes *MAMLD1* (hémizygotte, p.S602P), *RXFP2* (hétérozygote, p.A62T) et *PROKR2* (hétérozygote, p.R85C) (Figure 21).

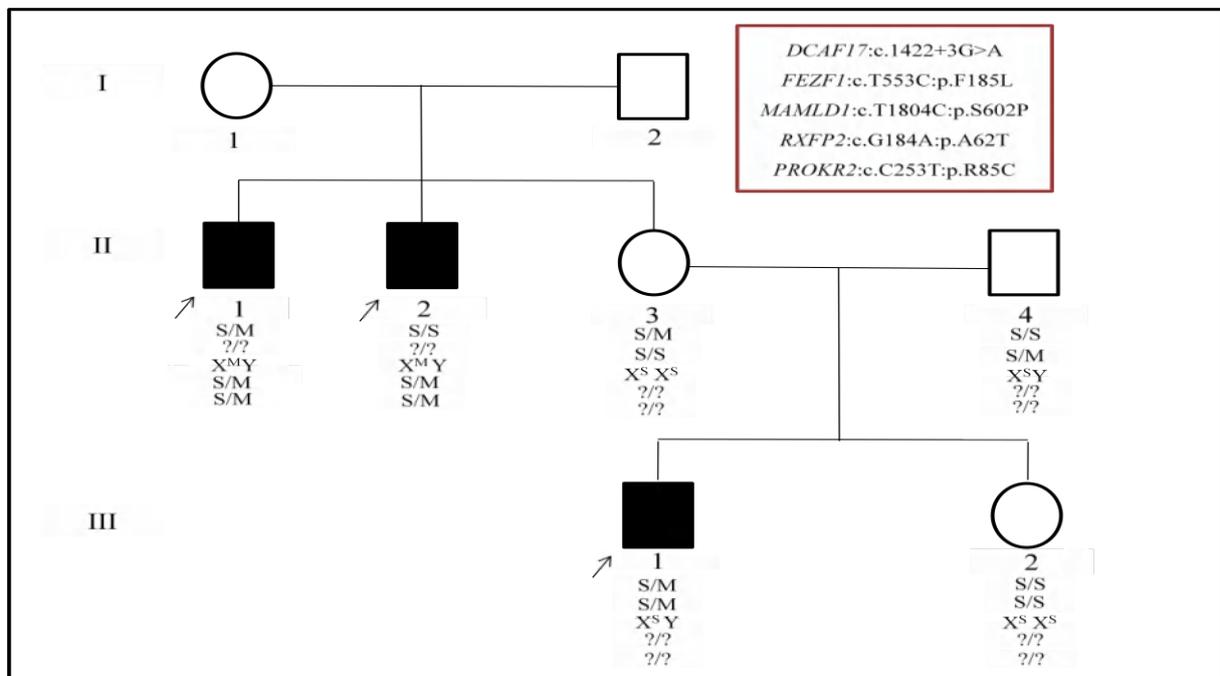


Figure 21. Pedigree et ségrégation représentatifs des 5 variants dans les gènes *DCAF17*, *FEZF1*, *MAMLD1*, *RXFP2* et *PROKR2* chez le patient 114 (III1), sa sœur (III2), ses parents (père : II3 ; mère : II4) ainsi que ses 2 oncles affectés (patients 66 : II1 et 67 : II2).

? : génotype indéterminée, M : muté, S : sauvage

Contrairement au variant du gène *PROKR2* (préalablement décrit), les deux variants identifiés dans les gènes *MAMLD1* et *RXFP2* sont absents de toutes les bases de données SNP publiques et sont de signification indéterminée.

Bien que le gène *MAMLD1*, localisé sur le chromosome X (Xq28), est exprimé dans les cellules fœtales de Sertoli et de Leydig pendant la biosynthèse des androgènes jusqu'à la formation des OGE mâles, et qu'*in vivo*, la diminution de son expression réduit considérablement la production de la testostérone dans les cellules tumorales de Leydig chez la souris, les souris *knockout* pour ce gène présentent des OGE normaux (avec des testicules hypotrophiques et une taille réduite des tubules séminifères et des cellules germinales) et se reproduisent de la même manière que les souris de type sauvage (Kageyama *et al.*, 2007 Miyado *et al.*, 2012 ; Miyado *et al.*, 2017).

Chez l'humain, *MAMLD1* a déjà été décrit comme un gène causal d'un large spectre phénotypique des DSD 46,XY. Des variations dans la séquence *MAMLD1* ont été principalement associées à des hypospadias, mais aussi à d'autres phénotypes DSD, dont le micropénis, et/ou la cryptorchidie, les DSD 46,XY avec des OGE féminins et les DGC 46,XY (Camats *et al.*, 2015 ; Ruiz-Arana *et al.*, 2015 ; Eggers *et al.*, 2016).

En outre, un variant faux-sens, homozygote, de type gain de fonction du gène *MAMLD1* a également été rapporté chez un patient présentant une 46,XX DG avec une clitoromégalie et une aménorrhée primaire (Brandao *et al.*, 2011).

Cependant, récemment, une controverse concernant le rôle causal des variants du gène *MAMLD1* dans le développement sexuel a été signalée, vu que des études fonctionnelles ont stipulé que plusieurs variants de ce gène présentent une activité de type sauvage et que les variants de perte de fonction sont les causes les plus vulnérables dans le phénotype DSD (Camats *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2020).

Le troisième variant mis en évidence chez les 2 frères concerne le gène *RXFP2*, situé sur le chromosome 13 (13q13.1). Ce gène code pour le récepteur d'une hormone analogue à l'insuline INSL3, produite par les cellules de Leydig et qui semble être un médiateur de la descente transabdominale des testicules (Akre *et al.*, 2009 ; Feng *et al.*, 2009).

Les alternances génétiques sont 17 fois plus probables chez les garçons présentant une cryptorchidie uni ou bilatérale, y compris les variants des gènes *INSL3* et *RXFP2* (Kolon *et al.*, 2004 ; Ferlin *et al.*, 2008). Ayers *et al.* (2019) ont rapporté pour la première fois, dans une analyse génomique, des variants récessifs du gène *RXFP2* chez une famille de 4 garçons atteints de cryptorchidie. Ces résultats ont été mis en évidence par une analyse fonctionnelle démontrant que la protéine *RXFP2* avait une faible expression à la surface cellulaire et n'a pas réussi à se lier à l'hormone *INSL3*.

Néanmoins, le neveu (patient 114) de ces 2 frères présente deux variants de signification indéterminée dans 2 autres gènes associée à l'HHC ; un variant faux-sens hétérozygote (p.F185L) dans la protéine *FEZF1* (*fez family zinc finger protein 1*), hérité de son père phénotypiquement normal, et un variant hétérozygote, touchant le site d'épissage (c.1422+3G>A) du gène *DCAF17* (*DDB1 and CULA associated factor 17*) également partagé par son oncle maternel (patient 66).

Conformément à la base de données « OMIM », les variants bialléliques du gène *FEZF1*, localisé sur le chromosome 7 (7q31.32), sont liés à l'HHC avec ou sans anosmie (OMIM 616030). Ce gène code pour un répresseur transcriptionnel, fortement présent au cours de l'embryogenèse dans l'épithélium olfactif, les amygdales et l'hypothalamus qui déterminent la voie des phéromones depuis le nez jusqu'au générateur d'impulsions de GnRH dans l'hypothalamus (Murata *et al.*, 2014).

Une autre étude a démontré que ce gène joue un rôle essentiel dans la migration embryonnaire des neurones à GnRH dans le cerveau pour la formation du réseau neuronal hypothalamique, essentiel à la sécrétion pulsatile de la GnRH et donc à la puberté et à la fertilité (Kotan *et al.*, 2014).

Le gène *DCAF17* est situé sur le chromosome 2 (2q31.1) et code pour la protéine nucléolaire *DCAF17* dont la fonction exacte est encore inconnue (Shah *et al.*, 2020). Selon l'hypothèse d'Alazami *et al.* (2010), les mutants homozygotes et hétérozygotes du gène *DCAF17* induisent une fonction nucléolaire défectueuse des voies de la biogénèse des ribosomes, le transport des ARNm, la régulation du cycle cellulaire, la reconnaissance des signaux, le vieillissement cellulaire et l'apoptose. La perturbation de l'un de ces processus peut être à l'origine de la pathogenèse du syndrome de Woodhouse-Sakati (OMIM 241080), qui est une forme syndromique d'HHC.

3.10.3 Troisième famille

En ce qui concerne cette famille, composée de 2 frères et 1 sœur manifestant des phénotypes DSD 46,XY similaires (patients 52, 53 et 82), un variant du site d'épissage (c.3347-1G>A), hétérozygote et de signification indéterminée, a été révélé dans le gène *SOS1* chez la sœur (patient 82). Ce variant a été hérité de la mère mais n'a pas été transmis aux frères affectés (patients 52 et 53), chez lesquels, aucun autre variant n'a été identifié dans les gènes connus pour être associés au DSD (Figure 22).

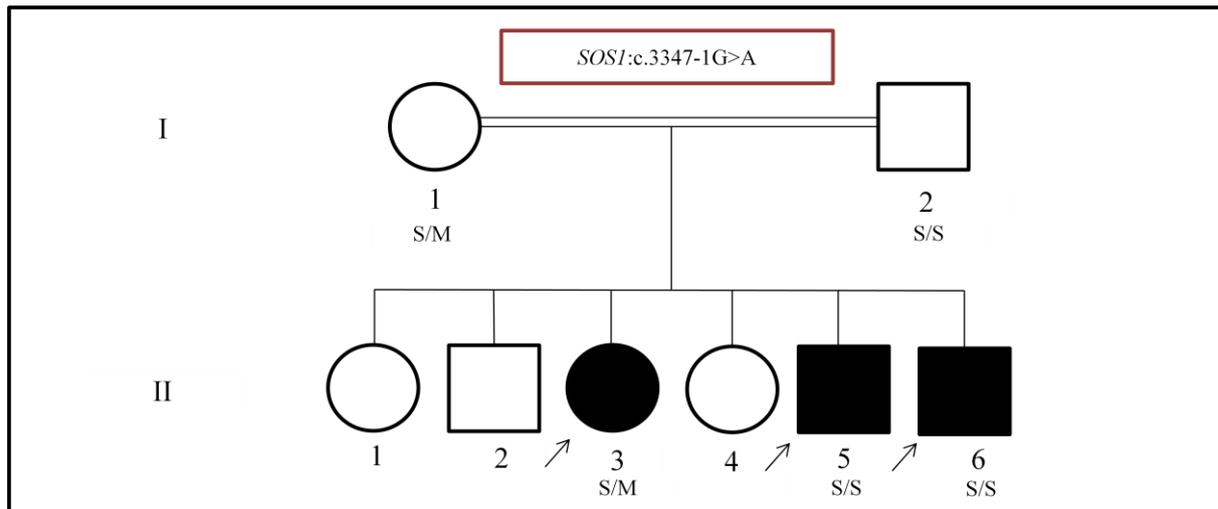


Figure 22. Pedigree et ségrégation représentatifs du variant identifié dans le gène *SOS1* chez la patiente 82 (II3), ses 2 frères affectés (patients 52 : II5 et 53 : II6) et leurs parents (mère : I1 ; père : I2).
M : muté, **S** : sauvage

Le gène *SOS1* (*son of seven less homolog 1*), localisé sur le chromosome 2 (2p22.1), code pour un facteur d'échange de nucléotides de guanine (GEF ; guanine nucleotide exchange factor) pour la régulation des protéines Ras en leur facilitant le changement entre l'état inactif (lié au GDP) et actif (lié au GTP) (Burns *et al.*, 2014).

Des variants pathogènes/probablement pathogènes de ce gène ont été décrits dans 10-20% des patients atteints du syndrome de Noonan (OMIM 610733) (Roberts *et al.*, 2007). D'autres études ont publié que le facteur *SOS1* est connu comme étant un des médiateurs clés de la voie de signalisation *FGFR1*. Cette dernière est impliquée dans la régulation du développement du mésenchyme épидидymaire ; un dysfonctionnement de cette voie, particulièrement l'expression des gènes *FGFR1* et *SOS1*, contribue à des troubles dans le développement de l'appareil reproducteur masculin notamment à une formation défectueuse de l'épididyme conduisant ainsi à une cryptorchidie uni ou bilatérale (Hadziselimovic *et al.*, 2010 ; Hadziselimovic, 2017).

3.10.4 Quatrième et cinquième familles

Au cours de cette investigation, l'analyse des données n'a pas permis d'identifier de variants potentiels dans 2 familles. La quatrième famille comprend des frères jumeaux monozygotes (patients 47 et 48) présentés à l'âge de 3 mois et demi avec un hypospadias périnéal (patient 47), et un hypospadias périnéal associé à une cryptorchidie bilatérale (patient 48).

La cinquième famille concerne une fille (patiente 13) et son frère (patient 14), nés comme les derniers enfants d'une fratrie de trois sœurs et un frère sains, de parents consanguins. Ces deux patients ont été présentés respectivement à l'âge de 7 jours et 2 jours avec un DSD 46,XY évoquant une dysgénésie gonadique.

3.11 DSD 46,XX

La détermination de variants causaux a longtemps été un challenge pour l'établissement d'un diagnostic moléculaire expliquant les phénotypes de DSD T/OT 46,XX. Dans une étude incluant 7 patients DSD 46,XX, Kim *et al.* (2017) n'ont pas pu clarifier le diagnostic génétique chez la plupart des patients, et cela est similaire aux données notées par Eggers *et al.* (2016) dans leur étude incluant 48 patients atteints de DSD 46,XX.

En accord avec l'étude menée récemment par Mazen *et al.* (2021), notant l'absence de causes génétiques liées au DSD après l'analyse du WES chez deux patients égyptiens atteints de DSD 46,XX, notre analyse n'a pas révélé des variants impliqués dans le phénotype de trois cas de DSD 46,XX, dont un patient (patient 123) présente un DSD T 46,XX avec un pénis courbé, un hypospadias périnéal, une cryptorchidie unilatérale, des testicules hypotrophiques, un utérus et un vagin hypoéchogènes.

Le deuxième patient (patient 124), diagnostiqué avec un DSD T 46,XX, présente un phallus de 2,5 cm, 2 orifices dont un hypospadias pénoscrotal et des testicules hypotrophiques en position scrotale. De plus, un cousin maternel de ce patient présente un hypospadias mais son ADN n'a pas été disponible pour cette étude.

Le troisième patient (patient 125) a été diagnostiqué avec un micropénis, un hypospadias périnéal, un utérus et une cavité vaginale. Les gonades sont palpables dans les régions inguinales où la gonade droite est caractérisée par un parenchyme ovarien avec de nombreux petits follicules, tandis que la gonade gauche est constituée d'un parenchyme testiculaire infantile indiquant un DSD OT 46,XX.

En effet, les DSD 46,XX (*SRY* négatif) sont très rares avec une prévalence de DSD 46,XX testiculaires de 1/20 000 à 1/100 000 hommes, en fonction des variations géographiques (Berglund *et al.*, 2017 ; Wang *et al.*, 2017).

Les DSD T/OT 46,XX sont particulièrement associés à des duplications ou des délétions dans les régions promotrices et amplificatrices des gènes de la famille SOX, dans 10-15% des cas, y compris les gènes *SOX9*, *SOX3* et *SOX10*, liés au principal gène de la détermination testiculaire « *SRY* » dans la gonade bipotentielle. Dans ces cas, le tissu testiculaire se développe et entraîne un certain degré de masculinisation des OGE et OGI. D'autres formes rares de DSD 46,XX peuvent survenir en raison de variants de type perte de fonction impliquant des gènes de la voie de signalisation WNT4/RSPO1. Cependant, l'étiologie de la majorité des cas DSD 46,XX reste inconnue (Arboleda *et al.*, 2014 ; Bashamboo *et al.*, 2017 ; Xu *et al.*, 2019).

Conclusion et perspectives

A la lumière de ce travail, l'analyse moléculaire utilisant l'approche WES et l'étude fonctionnelle *in silico* a permis d'identifier au minimum un variant génique causal, conformément aux recommandations de l'ACMG, dans 49,6% d'une cohorte de 125 patients présentant un DSD, originaires de 24 villes de l'Est et du Centre algériens. La population d'étude présente un large spectre phénotypique, 122 sujets sont diagnostiqués avec un DSD 46,XY dont 13,1% ont été élevés filles et 3 sujets avec un DSD 46,XX élevés comme des garçons.

Au total, 208 variants touchant 84 gènes ont été annotés dans notre population, dont 65 variants ont été classés comme pathogènes ou probablement pathogènes dans 43 gènes. Les variants des gènes *AR*, *HSD17B3*, *NR5A1* et *SRD5A2* sont les causes les plus fréquentes du DSD ainsi que les variants de deux gènes liés à l'HHC, *CHD7* et *PROKR2*. Parmi les 208 variants, 74% n'ont jamais été signalés précédemment dans la littérature dont 30 variants ont été classés comme pathogènes ou probablement pathogènes chez 24% des patients, dans 25 gènes différents. Ces résultats vont enrichir la base de données de variants géniques et ainsi à contribuer à une meilleure compréhension de la pathogenèse des DSD 46,XY.

Le WES a mis en évidence la contribution digénique voire multigénique dans divers phénotypes de DSD, principalement chez les patients DSD syndromiques 46,XY. En effet, un diagnostic moléculaire a été enregistré chez 69,2% des patients DSD syndromiques 46,XY, contre 42,2% des patients DSD non syndromiques 46,XY et 0% des patients DSD 46,XX.

Une pénétrance incomplète déterminée dans les cas familiaux suggère la variabilité phénotypique observée chez les patients présentant des variants géniques identiques au sein d'une même famille.

Le rendement diagnostique noté dans cette investigation pour les sujets dont les ADN parentaux sont disponibles pour le WES et/ou le séquençage Sanger, est similaire à celui des sujets dont les ADN parentaux ne sont pas disponibles, soit 56,1% contre 59,7%, respectivement. Cela suggère que le test des parents peut aider à établir un diagnostic génétique précis en classant les variants comme bénins, probablement bénins ou de signification indéterminée plutôt que pathogènes ou probablement pathogènes.

Ce travail confirme l'intérêt de l'étude du WES pour le diagnostic et la prise en charge des patients présentant un DSD. En effet, atteindre un diagnostic moléculaire est important pour éclairer la prise en charge du patient en ce qui concerne le développement éventuel du genre, l'évaluation de la fonction gonadique, le risque de cancer des gonades et la morbidité associée. En outre, la détermination de l'étiologie est souvent utile pour les familles, car elle fournit des informations sur le risque de récurrences.

Des variants de signification indéterminée dans les gènes *VEGFB* et *SCLY* identifiés chez des jumeaux monozygotes discordants pour le phénotype DSD, ainsi que dans le gène *NR2F2* déterminé chez un patient présentant probablement un HHC ont également été mis en évidence dans cette étude.

En perspectives :

- des recherches plus poussées, notamment des études *in vitro* ou *in vivo*, sont recommandées pour élucider le rôle des variants identifiés et élargir le spectre phénotypique associé aux gènes connus pour causer les DSD,
- d'autres technologies telles que l'aCGH (*array comparative genomic hybridization*) et le WGS (*whole genome sequencing*) sont également nécessaires pour détecter les causes génétiques chez les patients ne portant aucun variant, particulièrement l'étude des réarrangements chromosomiques et des régions introniques pour les patients présentant des formes de DSD syndromiques inexplicables,
- l'étude d'éventuelles interactions entre plusieurs gènes pouvant être impliqués dans la détermination/différenciation sexuelle est nécessaire,
- vu le nombre relativement restreint des recherches fondamentales consacrées aux relations gènes-environnement, l'interprétation des risques environnementaux dans les cas de DSD doit être prise en compte dans un proche avenir.

Références bibliographiques

- Abdullah MA, Katugampola M, Al-Habib S, et al. Ambiguous genitalia: medical, socio-cultural and religious factors affecting management in Saudi Arabia. *Ann Trop Paediatr.* 1991; 11(4): 343-348.
- Abualsaud D, Hashem M, AlHashem A, et al. Survey of disorders of sex development in a large cohort of patients with diverse Mendelian phenotypes. *Am J Med Genet A.* 2020; 185: 2789-2800.
- Acién P, and Acién M. Disorders of Sex Development: Classification, Review, and Impact on Fertility. *J Clin Med.* 2020; 9(11): 3555.
- Afifi HH, El-Ruby MO, El-Bassyouni HT, et al. The most encountered groups of genetic disorders in Giza Governorate, Egypt. *Bratisl Lek Listy.* 2010; 111(2): 626-629.
- Aglan M, Amr K, Ismail S, et al. Clinical and molecular characterization of seven Egyptian families with autosomal recessive robinow syndrome: Identification of four novel ROR2 gene mutations. *Am J Med Genet A.* 2015; 167(12): 3054-3061.
- Ahmed SF, Bashamboo A, Lucas-Herald, et al. Understanding the genetic aetiology in patients with XY DSD. *Br Med Bull.* 2013; 106: 67-89.
- Aittomäki K, Herva R, Stenman UH, et al. Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 3722-3776.
- Akre O, Pettersson A, and Richiardi L. Risk of contralateral testicular cancer among men with unilaterally undescended testis: A meta Int J Cancer. 2009; 124: 687-689.
- Al Jabri A, Al Naim N, and Al Dossari A. Homozygous Mutation in the FANCD2 Gene Observed in a Saudi Male Infant with Severe Ambiguous Genitalia. *Case Rep Endocrinol.* 2021; 16: 6686312.
- Alazami AM, Schneider SA, Bonneau D, et al. C2orf37 mutational spectrum in Woodhouse–Sakati syndrome patients. *Clin Genet.* 2010; 78: 585-590.
- Albrecht KH, and Eicher EM. Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Developmental Biology.* 2001; 240(1): 92-107.
- Alharbi KM, Al-Mazroea AH, Abdallah AM, et al. Targeted Next-Generation Sequencing of 406 Genes Identified Genetic Defects Underlying Congenital Heart Disease in Down Syndrome Patients. *Pediatr Cardiol.* 2018; 39(5): 1676-1680.
- Ali M, Hocking PM, McKibbin M, et al. Mpdz null allele in an avian model of retinal degeneration and mutations in human leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52(10): 7432-7440.
- Alkelai A, Olender T, Dode C, et al. Next-generation sequencing of patients with congenital anosmia. *Eur J Hum Genet.* 2017; 25(1): 1377-1387.
- Allard S, Adin P, Gouédard L, et al. Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of beta-catenin. *Dev. Camb. Engl.* 2000; 127: 3349-3360.

Al-Sinani A, Mula-Abed WAS, Al-Kindi M, et al. A Novel Mutation Causing 17- β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 3 Deficiency in an Omani Child: First Case Report and Review of Literature. *Oman Med J*. 2015; 30(2): 129-134.

Alswailem M, Alsagheir A, Ben Abbas B, et al. Molecular genetics of disorders of sex development in a highly consanguineous population. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2021; 208: 105736.

Alswailem MM, Alzahrani OS, Alghofaili L, et al. Molecular genetics and phenotype/genotype correlation of 5-alpha reductase deficiency in a highly consanguineous population. *Endocrine*. 2019; 63(2): 361-368.

Andersson S, Geissler WM, Wu L, et al. Molecular genetics and pathophysiology of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1996; 81: 130-136.

Arango NA, Lovell-Badge R, and Behringer RR. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell*. 1999; 99: 409-419.

Araujo SJ, Cela C, and Llimargas M. Tramtrack regulates different morphogenetic events during *Drosophila* tracheal development. *Development*. 2007; 134(20): 3665-3676.

Arboleda VA, Lee H, Sánchez FJ, et al. Targeted massively parallel sequencing provides comprehensive genetic diagnosis for patients with disorders of sex development. *Clin Genet*. 2013; 83(1): 35-43.

Arboleda VA, Sandberg DE, and Vilain E. DSDs: genetics, underlying pathologies and psychosexual differentiation. *Nature Reviews Endocrinology*. 2014; 10(10): 603-615.

Arlt W, and Krone N. Adult consequences of congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res*. 2007; 68: 158-164.

Ascoli M, Fanelli F, and Segaloff DL. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev*. 2002; 23: 141-174.

Audi L, Ahmed SF, Krone N, et al. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Approaches to molecular genetic diagnosis in the management of 238 differences/disorders of sex development (DSD): position paper of EU COST Action BM 1303 'DSDnet'. *Eur J Endocrinol*. 2018; 179(4): 197-206.

Audi L, Fernández-Cancio M, Carrascosa A, et al. Novel (60%) and recurrent (40%) androgen receptor gene mutations in a series of 59 patients with a 46,XY disorder of sex development. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(4): 1876-88.

Aydin KN, Saka F, Bas EK, et al. Frequency of Ambiguous Genitalia in 14,177 Newborns in Turkey. *JES*. 2019; 3(6): 1185-1195

Ayers K, Kumar R, Robevska G, et al. Familial bilateral cryptorchidism is caused by recessive variants in *RXFP2*. *J Med Genet*. 2019; 56(11): 727-733.

- Azoury SC, Reddy S, Shukla V, et al. Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) Mutation Related Syndromic Craniosynostosis. *Int. J. Biol. Sci.* 2017; 13(12): 1479-1488
- Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, et al. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. *Development.* 1994 ; 120(1): 189-197.
- Baetens D, Mendonca BB, Verdin H, et al. Noncoding variation in disorders of sex development. *Clin. Genet.* 2017; 91: 163-172.
- Baetens D, Verdin H, De Baere E, et al. Update on the genetics of differences of sex development (DSD). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2019; 33(3): 101271.
- Bagheri-Fam S, Sim H, Bernarda P, et al. Loss of Fgfr2 leads to partial XY sex reversal. *Dev. Biol.* 2008; 314(1): 71-83
- Baillet A, and Mandon-Pépin B. Mammalian ovary differentiation - A focus on female meiosis. 2012; 356(1-2): 13-23.
- Baillet A, Mandon-Pépin B, Veitia R, et al. La différenciation ovarienne précoce et son contrôle génétique. *Biol Aujourd'hui.* 2011; 205(4): 201-221.
- Bargy F, Morel-Bouvattier C, and Beaudoin S. Ambiguïtés sexuelles. *EMC – Gynécologie.* 2008; 3(2): 1-14.
- Bar-Maor JA, Groisman G, and Lam M. Antenatal torsion of the testes, a cause of vanishing testis syndrome. *Pediatr Surg Int.* 1993; 8: 236-238.
- Barseghyan H, Délot EC, and Vilain E. New technologies to uncover the molecular basis of disorders of sex development. *Mol Cell Endocrinol.* 2018; 468: 60-69.
- Bartels CF, Scacheri C, White L, et al. Mutations in the CHD7 Gene: The Experience of a Commercial Laboratory. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010; 14(6): 881-891.
- Bashamboo A, Eozenou C, Jorgensen A, et al. Loss of Function of the Nuclear Receptor NR2F2, Encoding COUP-TF2, Causes Testis Development and Cardiac Defects in 46,XX Children. *Am J Hum Genet.* 2018; 102(3): 487-493.
- Bashamboo A, and McElreavey K. Gene mutations associated with anomalies of human gonad formation. *Sex Dev.* 2013; 7(1-3):126-146.
- Bashamboo A, and McElreavey K. Consanguinity and disorders of sex development. *Hum Hered.* 2014; 77(1-4): 108-117.
- Bashamboo A, and McElreavey K. Mechanism of Sex Determination in Humans: Insights from Disorders of Sex Development. *Sex Dev.* 2016; 10(5-6): 313-325.
- Bashamboo A, Donohoue PA, Vilain E, et al. A recurrent p.Arg92Trp variant in steroidogenic factor-1 (NR5A1) can act as a molecular switch in human sex development. *Hum Mol Genet.* 2016; 25(16): 3446-3453.

- Bashamboo A, Eozenou C, Rojo S, et al. Anomalies in human sex determination provide unique insights into the complex genetic interactions of early gonad development. *Clin Genet* 2017; 91: 143-156.
- Belgorosky A, Pepe C, Marino R, et al. Hypothalamic-pituitary-ovarian axis during infancy, early and late prepuberty in an aromatase-deficient girl who is a compound heterozygote for two new point mutations of the CYP19 gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(11): 5127-5131.
- Bendsen E, Byskov AG, Andersen CY, et al. Number of germ cells and somatic cells in human fetal ovaries during the first weeks after sex differentiation. *Mol Hum Reprod*. 2005; 21(1): 30-35.
- Benko S, Gordon CT, Mallet D, et al. Disruption of a long distance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex development. *J Med Genet*. 2011; 48(12): 825-830.
- Berglund A, Johannsen TH, Stochholm K, et al. Incidence, prevalence, diagnostic delay, morbidity, mortality and socioeconomic status in males with 46,XX disorders of sex development: a nationwide study. *Hum. Reprod*. 2017; 32: 1751-1760.
- Bergman JEH, Janssen N, van der Sloot AM, et al. A novel classification system to predict the pathogenic effects of CHD7 missense variants in CHARGE syndrome. *Hum Mutat*. 2012; 33(8): 1251-1260.
- Biason-Lauber A, Konrad D, Meyer M, et al. Ovaries and female phenotype in a girl with 46,XY karyotype and mutations in the CBX2 gene. *J Hum Genet*. 2009; 84(5): 658-663.
- Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, et al. A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med* 2004; 351:792-798.
- Biason-Lauber A. Control of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010; 24(2): 163-186.
- Biason-Lauber A. WNT4, RSPO1, and FOXL2 in sex development. *Semin Reprod Med*. 2012; 30(5): 387-395.
- Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, et al. The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature*. 2000; 403(6772): 909-913.
- Bodian DL, Klein E, Iyer RK, et al. Utility of whole-genome sequencing for detection of newborn screening disorders in a population cohort of 1,696 neonates. *Genet Med*. 2016; 18(3): 221-230.
- Boron WF, and Boulpaep EL. Sexual Differentiation. *The Reproductive System. Medical Physiology*, 3e Ed. Evolve Elsevier. 2017. Pp 1312
- Bouty A, Ayers KL, Pask A, et al. The Genetic and Environmental Factors Underlying Hypospadias. *Sex Dev*. 2015; 9(5): 239-259.

- Brandao MP, Costa EM, Fukami M, et al. 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.* 2011; 707: 129-131.
- Brauner R, Bignon-Topalovic J, Bashamboo A, et al. Pituitary stalk interruption syndrome is characterized by genetic heterogeneity. *PloS One.* 2020; 15(12): 0242358.
- Brauner R, Picard-Dieval F, Lottmann H, et al. Familial forms of disorders of sex development may be common if infertility is considered a comorbidity. *BMC Pediatrics.* 2016; 16(1): 195.
- Brennan J, Karl J, and Capel B. Divergent vascular mechanisms downstream of Sry establish the arterial system in the XY gonad. *Dev Biol.* 2002; 244(2): 418-428.
- Brown CJ, Goss SJ, Lubahn DB, et al. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1989; 44: 264-269.
- Buonocore F, Clifford-Mobley O, King TFJ, et al. Next-Generation Sequencing Reveals Novel Genetic Variants (SRY, DMRT1, NR5A1, DHH, DHX37) in Adults With 46,XY DSD. *J Endocr Soc.* 2019; 3: 2341-2360.
- Burns MC, Sun Q, Daniels RN, et al. Approach for targeting Ras with small molecules that activate SOS-mediated nucleotide exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(9): 3401-3406.
- Butwicka A, Lichtenstein P, Landen M, et al. Hypospadias and increased risk for neurodevelopmental disorders. *J. Child Psychol. Psychiatry.* 2015; 56: 155-161.
- Callier P, Calvel P, Matevossian A, et al. Loss of Function Mutation in the Palmitoyl-Transferase HHAT Leads to Syndromic 46,XY Disorder of Sex Development by Impeding Hedgehog Protein Palmitoylation and Signaling. *PLoS Genet.* 2014; 10(5): 1004340.
- Calogero AE, Garofalo MR, Barone N, et al. Spontaneous regression over time of the germinal epithelium in a Y chromosome-microdeleted patient: case report. *Hum Reprod.* 2001; 16: 1845-1848.
- Camats N, Fernández-Cancio M, Audí L, et al. Broad phenotypes in heterozygous NR5A1 46,XY patients with a disorder of sex development: an oligogenic origin. *Eur J Hum Genet.* 2017; 26(9): 1329-1338.
- Camats N, Fernández-Cancio M, Audí L, et al. Human MAMLD1 gene variations seem not sufficient to explain a 46,XY DSD phenotype. *PLoS One.* 2015; 10(11): 0142831.
- Camats N, Pandey AV, Fernández-Cancio M, et al. 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.* 2012; 97(7): 1294-1306.
- Cameron FJ, Hageman RM, Cooke-Yarborough C, et al. A novel germ line mutation in SOX9 causes familial campomelic dysplasia and sex reversal. *Hum. Mol. Genet.* 1996; 5: 1625-1630.

- Cangiano B, Duminuco P, Vezzoli V, et al. Evidence for a Common Genetic Origin of Classic and Milder Adult-Onset Forms of Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism. *J Clin Med*. 2019 ; 8(1): 126.
- Cannarella R, Precone V, Guerri G, et al. Clinical Evaluation of a Custom Gene Panel as a Tool for Precision Male Infertility Diagnosis by Next-Generation Sequencing. *Life (Basel)*. 2020; 10(10): 242.
- Capalbo A, Valero RA, Jimenez-Almazan J, et al. Optimizing clinical exome design and parallel gene-testing for recessive genetic conditions in preconception carrier screening: Translational research genomic data from 14,125 exomes. *PLOS Genet*. 2019; 15(10): 1008409.
- Carlsson P, and Mahlapuu M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev. Biol*. 2002; 250: 1-23.
- Carvalho G, Malinverni AM, Moysés-Oliveira M, et al. The Natural History of a Man With Ovotesticular 46,XX DSD Caused by a Novel 3-Mb 15q26.2 Deletion Containing NR2F2 Gene. *J Endoc Soc*. 2019; 3(11): 2107-2113.
- Castro CCTD, Guaragna-Filho G, Calais FL, et al. Clinical and molecular spectrum of patients with 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (17-beta-HSD3) deficiency. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012; 56 (8): 533-539.
- Cattoni A, Spano A, Tulone A, et al. The Potential Synergic Effect of a Complex Pattern of Multiple Inherited Genetic Variants as a Pathogenic Factor for Ovarian Dysgenesis: A Case Report *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020; 11: 540683.
- Chassot AA, Bradford ST, Auguste A, et al. WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. *Dev. Camb. Engl*. 2012; 139: 4461-4472.
- Chassot AA, Gillot I, and Chaboissier MC. R-spondin1, WNT4, and the CTNNB1 signaling pathway: strict control over ovarian differentiation. *Rep*. 2014; 148(6): 97-110.
- Chellat D, Rezgoune ML, McElreavey K, et al. First Study of Microdeletions in the Y Chromosome of Algerian Infertile Men with Idiopathic Oligo- or Azoospermia. *Urol. Int*. 2013; 90(4): 455-459.
- Ciceri S, Gamba B, Corbetta P, et al. Genetic and epigenetic analyses guided by high resolution whole-genome SNP array reveals a possible role of CHEK2 in Wilms tumor susceptibility. *Oncotarget*. 2018; 9(75): 34079-34089.
- Clépet C, Schafer AJ, Sinclair AH, et al. The human SRY transcript. *Hum Mol Genet*. 1993; 2(12): 2007-2012.
- Collet C, Laplanche JL, Page J, et al. High genetic carrier frequency of Wilson's disease in France: discrepancies with clinical prevalence. *BMC Med Genet*. 2018; 19(1): 143.
- Cools M, Stenvert L, Drop S, Katja P, et al. Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new directions, moving frontiers. *Endocr. Rev*. 2006; 27(5): 468-484.

- Cory AT, Boyer A, Pilon N, et al. Presumptive pre-Sertoli cells express genes involved in cell proliferation and cell signalling during a critical window in early testis differentiation. *Mol. Reprod. Dev.* 2007; 74(12): 1491-1504.
- Cox KH, Oliveira LMB, Plummer L, et al. Modeling mutant/wild-type interactions to ascertain pathogenicity of PROKR2 missense variants in patients with isolated GnRH deficiency. *Hum Mol Genet.* 2018; 27(2): 338-350.
- Crisponi, L, Deiana, M, Loi A, et al. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat. Genet.* 2001; 27: 159-166.
- Croft B, Ayers K, Sinclair A, et al. Review disorders of sex development: The evolving role of genomics in diagnosis and gene discovery. *Defects Res. C.* 2016; 108(4): 337-350.
- D'Argenio V, Cariati F, and Tomaiuolo R. One4Two: An Integrated Molecular Approach to Optimize Infertile Couples' Journey. *Genes (Basel).* 2021; 12(1): 60.
- Damiani D, Fellous M, McElreavey K, et al. True hermaphroditism: clinical aspects and molecular studies in 16 cases. *Eur J Endocrinol.* 1997; 136: 201-204.
- Damiani D, Masculli MA, Almeida MJ, et al. Persistence of Müllerian remnants in complete androgen insensitivity syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2002; 15: 1553-1556.
- Dawson PA, Leea S, Ewinga AD, et al. Whole genome investigation of an atypical autism case identifies a novel *ANOS1* mutation with subsequent diagnosis of Kallmann syndrome. *Mol Genet Metab Rep.* 2020; 23(1): 100593.
- De Felici M. Origin, Migration, and Proliferation of Human Primordial Germ Cells. In *Oogenesis*, G. Coticchio, D.F. Albertini, and L. De Santis, eds. (London: Springer London), 2013. 2: 19-37.
- de Groota CG, van den Berga A, Ballieux BE, et al. Determinants of Advanced Bone Age in Childhood Obesity. *Horm Res Paediatr.* 2017; 87(4): 254-263.
- de Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, et al. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18(11): 6653-6665.
- de Santa Barbara P, Méjean C, Moniot B, et al. Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclicadenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. *Biol Reprod.* 2001; 64(3): 775-783.
- DeCherney AH, Nathan L, Laufer N, et al. *Embryology of the Urogenital System & Congenital Anomalies of the Genital Tract. CURRENT Diagnosis & Treatment: Obstetrics & Gynecology*, 11e. McGraw-Hill LANGE. 2012; 53.
- DeFalco T, Takahashi S, and Capel B. Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Dev. Biol.* 2011; 352(1): 14-26.

di Clemente N, Wilson CA, Faure E, et al. The anti-Müllerian hormone type II receptor: insights into the binding domains recognized by a monoclonal antibody and the natural ligand. *Mol. Endocrinol.* 1994; 8(1): 1006-10020.

DiFrancesco JC, Castellotti B, Milanese R, et al. *Epilepsy Research*. HCN ion channels and accessory proteins in epilepsy: genetic analysis of a large cohort of patients and review of the literature. 2019; 153 (1): 49-58.

Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, et al. Kallmann Syndrome: Mutations in the Genes Encoding Prokineticin-2 and Prokineticin Receptor-2. *PLoS Genetics.* 2006; 2(10): 1648-1652.

Domenice S, Arnhold IJP, Costa EMF, et al. 46,XY Troubles du développement sexuel : Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al. Editeurs. South Dartmouth (MA): MD Text.com, Inc.; 2000-2017.

Duffin K, Bayne RAL, Childs AJ, et al. The forkhead transcription factor FOXL2 is expressed in somatic cells of the human ovary prior to follicle formation. *Mol. Hum. Reprod.* 2009; 15(12): 771-777.

Dutta S, Whicher JR, Hansen D, et al. Structure of a modular polyketide synthase. *Nature.* 2014. 26; 510(7506): 512–517.

Eggers S, and Sinclair A. Mammalian sex determination-insights from humans and mice. *Chromosome Res.* 2012; 20(1): 215-238.

Eggers S, Ohnesorg T, and Sinclair A. Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nat Rev Endocrinol.* 2014; 10(11): 673-683.

Eggers S, Sadedin S, van den Bergen JA, et al. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biol.* 2016; 17(1): 243.

El Zaiat M. Cibles et voies de signalisation régulées par FOXL2 au cours de la morphogenèse ovarienne précoce. Thèse de doctorat. Université Paris-Saclay. 2015; Pp : 317.

El-Khairi R, and Achermann JC. Steroidogenic factor-1 and human disease. *Semin Reprod Med* 2012; 30: 374-381.

Encha-Razavi F, and Escudier E. Embryologie humaine : de la molécule à la clinique. 4e édition. Elsevier Masson. 2008 ; Pp : 376.

Engeli TR, Tsachaki M, Hassan HA, et al. Biochemical Analysis of Four Missense Mutations in the HSD17B3 Gene Associated With 46,XY Disorders of Sex Development in Egyptian Patients. *J Sex Med.* 2017; 14(9): 1165-1174.

Eozenou C, Bashamboo A, Bignon-Topalovic J, et al. The TALE homeodomain of PBX1 is involved in human primary testis-determination. *Hum Mutat.* 2019; 40: 1071-1076.

Eozenou C, Gonen N, Touzon SM, et al. Testis formation in XX individuals resulting from novel pathogenic variants in Wilms' tumor 1 (WT1) gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020; 117: 13680-13688.

- Ergun-Longmire B, Vinci G, Alonso L, et al. Clinical, hormonal and cytogenetic evaluation of 46,XX males and review of the literature. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2005; 18: 739-748.
- Feng S, Ferlin A, Truong A, et al. Signalisation INSL3/RXFP2 dans la descente testiculaire. *Ann NY Acad Sci.* 2009; 160: 197-204.
- Ferlin A, Zuccarello D, Zuccarello B, et al. Les alternances génétiques associées à la cryptorchidie. *JAMA.* 2008; 300: 2271-2266.
- Ferrari I, Bouilly J, Beau I, et al. Impaired protein stability and nuclear localization of NOBOX variants associated with premature ovarian insufficiency. *Hum Mol Genet.* 2016; 25(23): 5223-5233.
- Ferraz-de-Souza B, Lin L, and Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2011; 336 (1-2): 198-205.
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature.* 1994; 372(6506): 525-530.
- Freeze HH. Understanding human glycosylation disorders: biochemistry leads the charge. *J Biol Chem.* 2013; 288: 6936-6945.
- Garcia-Moreno SA, Lin YT, Futtner CR, et al. CBX2 is required to stabilize the testis pathway by repressing Wnt signaling. *PLoS Genet.* 2019; 15(5): 1007895.
- Garg V, Kathiriya IS, Barnes R, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature.* 2003; 424: 443-447.
- Geissler WM, Davis DL, Wu L, et al. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet.* 1994; 7: 34-39.
- Georg I, Bagheri-Fam S, Knowler KC, et al. Mutations of the SRY-responsive enhancer of SOX9 are uncommon in XY gonadal dysgenesis. *Sex Dev.* 2010; 4(6): 321-325.
- Gilbert SF. Principles of developmental biology. The anatomical tradition. *Developmental Biology.* 7th edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. 2003; 1: 3-24.
- Gleeson H, Davis J, Jones J, et al. Challenge of delivering endocrine care and successful transition to adult services in adolescents with congenital adrenal hyperplasia : Experience in a single centre over 18 years. *Clin Endocrinol.* 2013;78(1): 23-8
- Gomes NL, de Paula LCP, Silva JM, et al. A 46,XX testicular disorder of sex development caused by a Wilms' tumour Factor-1 (WT1) pathogenic variant. *Clin Genet.* 2019; 95(1): 172-176.
- Gorsic LK, Kosova G, Werstein B, et al. Pathogenic Anti-Müllerian Hormone Variants in Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2017; 102(8): 2862-2872.
- Grinspon RP, and Rey RA. Molecular characterization of XX maleness *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20 (23): 6089.

- Grinspon RP, Nevado J, Mori Alvarez MeL, et al. 46,XX ovotesticular DSD associated with a SOX3 gene duplication in a SRY-negative boy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016; 85(4): 673-675.
- Guerrero-Fernández J, San Julián CA, Conde IB, et al. Management guidelines for disorders/different sex development (DSD). *Anales de Pediatría (English Edition)*. 2018; 89(5): 315-319.
- Guran T, Yesil G, Turan, S, et al. PPP2R3C gene variants cause syndromic 46,XY gonadal dysgenesis and impaired spermatogenesis in humans. *Eur J Endocrinol*. 2019; 1(80): 291-309.
- Hadjiathanasiou CG, Brauner R, Lortat-Jacob S, et al. True hermaphroditism: genetic variants and clinical management. *J Pediatr*. 1994; 125: 738-744.
- Hadziselimovic F. On the descent of the epididymo-testicular unit, cryptorchidism, and prevention of infertility. *Basic and Clinical Andrology*. 2017; 27(21): 5-16.
- Hadziselimovic NO, de Geyter C, Demougin P and al. Decreased Expression of FGFR1, SOS1, RAF1 Genes in Cryptorchidism. *Urol. Int*. 2010; 84(3): 353-361.
- Hagan A and Amarillo IE. Small copy-number variations involving genes of the FGF pathway in differences in sex development. *Human Genome Variation*. 2017; 13(4): 17011.
- Hagberg CE, Falkevall A, Wang X, et al. Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature*. 2010; 464(7290): 917-921.
- Hamanaka K, Takata A, Uchiyama Y, et al. MYRF haploinsufficiency causes 46,XY and 46,XX disorders of sex development: bioinformatics consideration. *Hum Mol Genet*. 2019; 28: 2319-2329.
- Harris A, Siggers P, Corrochano S, et al. ZNRFB3 functions in mammalian sex determination by inhibiting canonical WNT signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences. Proc Natl Acad Sci USA*. 2018; 115: 5474-5479.
- Hatano O, Takakusu A, Nomura M, et al. Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes Cells*. 1996; 1(7): 663-671.
- Hatipoğlu N, and Kurtoğlu S. Micropenis: etiology, diagnosis and treatment approaches. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2013; 5(4): 217-223.
- Hawkins JR, Taylor A, Goodfellow PN, et al. Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am J Hum Genet*. 1992; 51(5): 979- 984.
- Hegarty PK, Mushtaq I, and Sebire NJ. Natural history of testicular regression syndrome and consequences for clinical management. *J Pediatr Urol*. 2006; 3: 2062-2088.
- Heksch RA, Matheson MA, Tishelman AC, et al. Testicular regression syndrome: practice variation in diagnosis and management. *Endocr Pract*. 2019; 25(8): 779-786.
- Hemesath T. Anomalias da Diferenciação Sexual: representações parentais sobre a constituição da identidade de generalo. *Psicol Repl Cr í t*. 2013; 26(3): 583-590.

- Hohenstein P, and Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet.* 2006; 15(2): 196-201.
- Hornig NC, de Beaufort C, Denzer F, et al. A Recurrent Germline Mutation in the 5'UTR of the Androgen Receptor Causes Complete Androgen Insensitivity by Activating Aberrant uORF Translation. *PLoS One.* 2016; 11(4): 0154158.
- Hossain A, and Saunders GF. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem.* 2001; 276: 16817-16823.
- Hou Q, Wu J, Zhao Y, et al. Genotypic and phenotypic spectrum of CCDC141 variants in a Chinese cohort with congenital hypogonado tropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol.* 2020; 183(3): 245-254.
- Houghtaling S, Timmers C, Noll M, et al. Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Genes Dev.* 2003; 17(16): 2021-35.
- Hughes IA, McKay-Bounford K, et al. Next generation sequencing (NGS) to improve the diagnosis and management of patients with disorders of sex development (DSD). *Endocr connect.* 2019. 8(2): 100-110.
- Hughes IA, and Acerini CL. Factors controlling testis descent. *Eur. J. Endocrinol.* 2008; 159 (1): 7582.
- Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, et al. Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child.* 2006; 91(7): 554-563.
- Huhtaniemi I, and Alevizaki M. Gonadotrophin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006; 20: 561-576.
- Hung TJ, and Kemphues KJ. PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development.* 1999; 126 (1): 1271-1235.
- Hutchins B, Damla Kotan L, Taylor-Burds C, et al. CCDC141 Mutation Identified in Anosmic Hypogonadotropic Hypogonadism (Kallmann Syndrome) Alters GnRH Neuronal Migration. *Endocrinology.* 2016; 157(5): 1956-1966.
- Hutson TE, Bukowski RM, Rini BI, and al. Efficacy and safety of sunitinib in elderly patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2014; 110(5): 1125-1132.
- Hutson JM, Grover SR, O'Connell M, et al. Malformation syndromes associated with disorders of sex development. *Nat Rev Endocrinol.* 2014; 10 (8), 476-487.
- Hyon C, and Rouen A. Between genetic determinism and gender theory. *Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie.* 2013; 15(1): 96-105.
- Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, et al. Steroid 5alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science.* 1974; 186: 1213-1215.

Imperato-McGinley J, Peterson RE, Gautier T, et al. Androgens and the evolution of male-gender identity among male pseudohermaphrodites with 5-alpha-reductase deficiency. *New Eng. J. Med.* 1979; 300: 1233-1237.

Ishida M, Cullup T, Boustred C, et al. A targeted sequencing panel identifies rare damaging variants in multiple genes in the cranial neural tube defect, anencephaly. *Clin Genet.* 2018; 93(1): 870-879.

Ittisoponpisan S, and David A. Structural Biology Helps Interpret Variants of Uncertain Significance in Genes Causing Endocrine and Metabolic Disorders. *J Endocr Soc.* 2018; 2(8): 842-854.

Jakob S, and Lovell-Badge R. Sex determination and the control of Sox9 expression in mammals *FEBS J.* 2011; 278(7): 1002-1009.

Jiang X, Charlat O, Zamponi R, et al. Dishevelled promotes Wnt receptor degradation through recruitment of ZNRF3/RNF43 E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell.* 2015; 58(3):522-533.

Jiang X, Teng Y, Chen X, et al. Six novel Mutation analysis of the androgen receptor gene in 17 Chinese patients with androgen insensitivity syndrome. *Clin Chim Acta.* 2020; 506: 180-186.

Jørgensen A, Lindhardt Johansen M, Juul A, et al. Pathogenesis of germ cell neoplasia in testicular dysgenesis and disorders of sex development. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; 45: 124-137.

Jørgensen CV, and Bräuner-Osborne H. Pharmacology and physiological function of the orphan GPRC6A receptor. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2020 ; 126(1): 77-87.

Josso N. *Physiologie de la reproduction humaine. Les Etats Intersexués et les Ambiguïtés Sexuelles.* EMC. Gynécologie. 1988; 8: 20-30

Jost A. A new look at the mechanism controlling sex differentiation in mammals. *Johns Hopkins Med J.* 1972; 130: 28-36.

Kageyama R, Ohtsuka T, and Kobayashi T. The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development.* 2007; 134(7): 1243-1251.

Kalfa N, Mahamat-Nour AD, Philibert P, et al. Le développement des organes génitaux GenitaliaDevelopment. *Revue de Médecine Périnatale.* 2015; 7: 128-136.

Kanavy MD, McNulty SM, Jairath MK, et al. Comparative analysis of functional assay evidence use by ClinGen Variant Curation Expert Panels. *Genome Med.* 2019; 11(1): 77.

Kaňová N, and Bičíková M. Hyperandrogenic states in pregnancy. *Physiol Res.* 2011; 60(2): 243- 252.

Karaca E, Harel T, Pehlivan D, et al. Genes that Affect Brain Structure and Function Identified by Rare Variant Analyses of Mendelian Neurologic Disease. *Neuron.* 2015; 88(3): 499-513.

- Karkazis KA. Early Genital Surgery to Remain Controversial. *Pediatrics*. 2006; 118(2): 814-815.
- Karl J, and Capel B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev. Biol.* 1998; 203: 323-333.
- Katoh-Fukui Y, Miyabayashi K, Komatsu T and al. Cbx2, a polycomb group gene, is required for Sry gene expression in mice. *Endocrinology*. 2012; 153: 913-924.
- Katoh-Fukui Y, Owaki A, Toyama Y, et al. Mouse Polycomb M33 is required for splenic vascular and adrenal gland formation through regulating Ad4BP/SF1 expression. *Blood*. 2005; 106(5): 1612-20.
- Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Shiroishi T, et al. Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature*. 1998; 393: 688-692
- Kaya C, Bektic J, Schwentner, et al. The efficacy of DHT transdermal gel before primary hypospadias surgery: a prospective, controlled randomized study. *J urol*. 2008; 179(2): 648-658.
- Kilcoyne KR, Smith LB, Atanassova N and al. Fetal programming of adult Leydig cell function by androgenic effects on stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(18): 1924-1932.
- Kim JH, Kang E, Heo S, et al. Diagnostic yield of targeted gene panel sequencing to identify the genetic etiology of disorders of sex development. *Mol Cell Endocrinol*. 2017; 444: 19-25.
- Kim Y, Bingham N, Sekido R, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104: 16558-16563.
- Kleinemeier E, Jurgensen M, Lux A, et al. Disorders of Sex Development Network Working Group. Psychological adjustment and sexual development of adolescents with disorders of sex development. *J Adolesc Health*. 2010; 47(5): 463-471.
- Knarston I, Ayers K, and Sinclair A. Molecular mechanisms associated with 46,XX disorders of sex development. *Clin Sci (Lond)*. 2016; 130(6): 421-432.
- Knarston IM, Robevska G, van den Bergen JA, et al. NR5A1 gene variants repress the ovarian-specific WNT signaling pathway in 46,XX disorders of sex development patients. *Hum Mutat*. 2019; 40(2): 207-216.
- Koff SA, and Jayanthi VR. Preoperative treatment with human chorionic gonadotropin in infancy to decrease the severity of proximal hypospadias and chordee. *J Urol*. 1999; 162(4): 1435-1439.
- Kolesinska Z, Acierno J, Ahmed SF, et al. Integrating clinical and genetic approaches in the diagnosis of 46,XY disorders of sex development. *Endocr connect*. 2018; 7(12): 1480-1490.
- Kolon TF, Patel RP, and Huff DS. Cryptorchidism: diagnosis, treatment, and long-term prognosis. *Urol Clin Amérique du Nord*. 2004; 31: 469-480.

- Kotan LD, Cooper C, Darcan S, et al. Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism Caused by Inactivating Mutations in SRA1. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2016 ; 8(2): 125-134.
- Kotan LD, Hutchins BI, Ozkan Y, et al. Mutations in FEZF1 Cause Kallmann Syndrome. *Am J Hum Genet*. 2014; 95(3): 326-331.
- Krawczynska N, Wierzba J, and Wasag B. Genetic Mosaicism in a Group of Patients With Cornelia de Lange Syndrome. *Front Pediatr*. 2019; 7(1): 203.
- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell*. 1993; 74 (4): 679-691.
- Krob G, Braun A, and Kuhnle U. True hermaphroditism: geographical distribution, clinical findings, chromosomes and gonadal histology. *Eur J Pediatr*. 1994 ; 153: 2-10
- Kruyer H, Mila M, Glover G, et al. Fragile X syndrome and the (CGG)_n mutation: Two families with discordant MZ twins. *Am J Med Genet*. 1994; 54 (3): 437-442.
- Kunitomo M, Khokhar A, Kresge C, et al. 46,XY DSD and limb abnormalities in a female with a de novo LHX9 missense mutation. *Am J Med Genet A*. 2020; 182(12):2887-2890.
- Kusaka M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, et al. Abnormal epithelial cell polarity and ectopic epidermal growth factor receptor (EGFR) expression induced in Emx2 KO embryonic gonads. *Endocrinology*. 2010; 151(12): 5893-5904.
- Lal N, Puri K, and Rodrigues B. Vascular Endothelial Growth Factor B and Its Signaling. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2018; 5(39): 1-9.
- López M, Torres L, Mández JP, et al. Traits cliniques et découvertes moléculaires chez 46,XX mâles. *Clin Genet*. 1995; 48 : 29-34.
- Lavery R, Chassot AA, Pauper E, et al. Testicular differentiation occurs in absence of R-spondin1 and Sox9 in mouse sex reversals. *PLoS Genet*. 2012 ; 8 (12): 1003170.
- Lawson KA, and Hage WJ. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp*. 1994; 182: 68-84.
- Ledig S, Hiort O, Wunsch L, et al. Partial deletion of DMRT1 causes 46,XY ovotesticular disorder of sexual development. *Eur J Endocrinol*. 2012; 167(1): 119-124.
- Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, et al. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics*. 2006; 118(2): 488-500.
- Li L, Su C, Fan L, et al. Clinical and molecular spectrum of 46,XY disorders of sex development that harbour MAMLD1 variations: case series and review of literature. *Orphanet J Rare Dis*. 2020; 15(1): 188.
- Liao LM, Tacconelli E, Wood D, et al. Adolescent girls with disorders of sex development: a needs analysis of transitional care. *J Pediatr Urol*. 2010; 6(6): 609-613.
- Lin L, and Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev*. 2008; 24(5): 2002-2009.

- Lin L, Ercan O, Raza J, et al. Variable phenotypes associated with aromatase (CYP19) insufficiency in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 982-990.
- Lin YT, and Capel B. Cell fate commitment during mammalian sex determination. *Current Opinion in Genetics and Development.* 2015; 32: 144-152.
- Lohiya N, Khadilkar V, Mehta K, et al. Two novel mutations with 17 hydroxylase deficiency6 Alpha and beta presenting as 46XY disorders of sexual development. *Indian J Child Health.* 2019; 11(6): 623-626.
- Longoni M, Russella MK, High FA, et al. Prevalence and penetrance of ZFPM2 mutations and deletions causing congenital diaphragmatic hernia. *Clin Genet.* 2015; 87(4): 362-367.
- Lubianca J, Costa E, de Paula L, et al. Anomalias da Diferenciação Sexual, do útero e da vagina. Dans : Passos EP, Ramos JGL, Martins-Costa SH, Magalhães JA, Menke CH, Freitas F, éditeurs. *Rotinas em Ginecologia. 7e Ed. Porto Alegre : Artmed 2017. Pp. 111-137.*
- Luo X, Ikeda Y, and Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell.* 1994; 77(4): 481-490.
- Luu-The V, Labrie C, Simard J, et al. Structure of two intandem human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase genes. *Mol Endocrinol.* 1990; 4: 268-275.
- Mahmood U, Méjécasse C, Ali SMA, et al. A Novel Splice-Site Variant in CACNA1F Causes a Phenotype Synonymous with Åland Island Eye Disease and Incomplete Congenital Stationary Night Blindness. *Genes (Basel).* 2021; 12(2): 171.
- Maier EM, Leitner C, Löhrs U, et al. True hermaphroditism in an XY individual due to a familial point mutation of the SRY gene. *JPEM.* 2003; 16: 575-580.
- Maioli M, Gnoli M, Boarini M, et al. Genotype–phenotype correlation study in 364 osteogenesis imperfecta Italian patients. *Eur. J. Hum. Genet.* 2019; 27: 1090-1100.
- Mamsen LS, Ernst EH, Borup R, et al. Temporal expression pattern of genes during the period of sex differentiation in human embryonic gonads. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 15961.
- Mandel H, Shemer R, Borochowitz ZU, et al. SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *Am J Hum Genet.* 2008; 82: 39-47.
- Marchetti PM, and Barth JH. Clinical biochemistry of dihydrotestosterone. *Ann. Clin. Biochem.* 2013; 50(2): 95-107.
- Marozzi A, Manfredini E, Tibiletti MG, et al. Molecular definition of Xq common-deleted region in patients affected by premature ovarian failure. *Hum Genet.* 2000; 107: 304-311.
- Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, et al. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr. Biol.* 1997; 7: 958-968.
- Martinez de LaPiscina I, de Mingo C, Riedl S, et al. GATA4 Variants in Individuals With a 46,XY Disorder of Sex Development (DSD) May or May Not Be Associated With Cardiac Defects Depending on Second Hits in Other DSD Genes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018; 9: 142.

- Matson CK, Murphy MW, and Sarver AL. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*. 2011; 476(7358): 101-104.
- Mazen I, Abdel-Hamid M, Mekkawy M, et al. Identification of NR5A1 mutations and possible digenic inheritance in 46,XY gonadal dysgenesis. *Sex Dev*. 2016; 10(3): 147-151.
- Mazen I, Hiort O, Bassiouny R, and al. Differential diagnosis of disorders of sex development in Egypt. *Horm Res*. 2008; 70(2): 118-123.
- Mazen I, Mekkawy M, Kamel A, et al. Advances in genomic diagnosis of a large cohort of Egyptian patients with disorders of sex development. *American Journal of medical genetics Part A*. 2021; 185(6): 1666-1677.
- McCarthy HJ, Bierzynska A, Wherlock M, et al. Simultaneous Sequencing of 24 Genes Associated with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013; 8(4): 637-648.
- McCormack SE, Li D, Kim YJ, et al. Digenic Inheritance of PROKR2 and WDR11 Mutations in Pituitary Stalk Interruption Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017; 102(7): 2501-2507.
- McElreavey K, Jorgensen A, Eozenou C, et al. 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*. 2020; 22(1): 150-159.
- Mendonca BB, Domenice S, Arnhold IJ, et al. 46,XY disorders of sex development (DSD). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009; 70(2): 173-187.
- Meyers CM, Boughman JA, et al. Gonadal (ovarian) dysgenesis in 46,XX individuals: frequency of the autosomal recessive form. *Am J Med Genet*. 1996; 63: 518-524.
- Middendorff R, Müller D, Mewe M, et al. The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(7): 3486-3499.
- Migeon BR, Brown TR, Axelman J, et al. Studies of the locus for androgen receptor: localization on the human X chromosome and evidence for homology with the Tfm locus in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78: 6339-6343.
- Migeon CJ, and Wisniewski AB. Human sex differentiation and its abnormalities. *Human sex differentiation and its abnormalities*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2003; 17: 1-18.
- Mihara H, Kurihara T, Watanabe T, et al. cDNA cloning, purification, and characterization of mouse liver selenocysteinylase: candidate for selenium delivery protein in selenoprotein synthesis. *J Biol Chem*. 2000; 275(9): 6195-6200.
- Miller WL, and Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev*. 2011; 32(1): 81-151.
- Miyado M, Nakamura M, Miyado K, et al. Maml1 deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal Leydig cells but permits normal genital and reproductive development. *Endocrinology*. 2012; 153(12): 6033-6040.

- Miyado M, Yoshida K, Miyado K, et al. Knockout of murine *Mamld1* impairs testicular growth and daily sperm production but permits normal postnatal androgen production and fertility. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(6): 1300.
- Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, et al. Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development.* 1997; 124(9): 1653-1664.
- Molho-Pessach V, Ramot Y, Camille F, et al. H syndrome: The first 79 patients. *J Am Acad of Dermatol.* 2014; 70(1): 80-88.
- Moniot B, Declosmenil F, Barrionuevo F, et al. The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Dev. Camb. Engl.* 2009; 136: 1813-1821.
- Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, et al. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet.* 2004; 5(9): 691-701.
- Morohashi K, Honda S, Inomata Y, et al. A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *J Biol Chem.* 1992; 267: 17913-17919.
- Morris LF, Park S, Daskivich T, et al. Virilization of a femal infant by a maternal adrenocortical carcinoma. *Endocr Pract.* 2011; 17(2): 26-31.
- Morrisey EE, Ip HS, Tang Z, et al. GATA-4 activates transcription via two novel domains that are conserved within the GATA-4/5/6 subfamily. *J Biol Chem.* 1997; 272(13): 8515-8524.
- Mula-Abed WA, Pambinezhuth FB, Al-Kindi MK, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to 17-alpha-hydroxylase/17,20-lyase deficiency presenting with hypertension and pseudohermaphroditism: First case report from Oman. *Oman Med J.* 2014; 29(1): 55-59.
- Mullen RD, and Behringer RR. Molecular Genetics of Müllerian Duct Formation, Regression and Differentiation. *Sex. Dev.* 2014; 8: 281-296.
- Mullis PE, Yoshimura N, Kuhlmann B, et al. Aromatase deficiency in a female who is compound heterozygote for two new point mutations in the P450arom gene: impact of estrogens on hypergonadotropic hypogonadism, multicystic ovaries, and bone densitometry in childhood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 1739-1745.
- Munger SC, Natarajan A, Looger LL, et al. Fine time course expression analysis identifies cascades of activation and repression and maps a putative regulator of mammalian sex determination. *PLoS Genetics.* 2013; 9(7): 1003630.
- Murata K, Tamogami S, Ito M, et al. Identification of an olfactory signal molecule that activates the central regulator of reproduction in goats. *Curr. Biol.* 2014; 24: 681-686.
- Nagaraja MR, Prakash Gubbala S, Wilma Delphine Silvia CR, et al. Molecular diagnostics of disorders of sexual development: An Indian survey and systems biology perspective. *Syst Biol Reprod Med.* 2019; 65(2): 105-120.

- Nakanishi Y, Akiyama N, Tsukaguchi T, et al. The Fibroblast Growth Factor Receptor Genetic Status as a Potential Predictor of the Sensitivity to CH5183284/Debio1347, a Novel Selective FGFR Inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 2014; 13(11): 2547-2558.
- Neocleous V, Fanis P, Toumba M, et al. GnRH Deficient Patients With Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism: Novel Genetic Findings in ANOS1, RNF216, WDR11, FGFR1, CHD7 and POLR3A Genes in a Case Series and Review of the Literature. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020; 11(1): 626.
- Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13(12): 767-779.
- Noavar S, Behroozi S, Tatarchegh T, et al. A novel homozygous frame-shift mutation in the SLC29A3 gene: a new case report and review of literature. *BMC Med Genet.* 2019; 20(147): 1-7.
- Nordenskjold A, Fricke G, and Anvret M. Absence of mutations in the WT1 gene in patients with XY gonadal dysgenesis. *Hum. Genet.* 1995; 96: 102-104.
- O'Bryan MK, Takada S, Kennedy CL, et al. Sox8 is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility. *Dev Biol.* 2008; 316(2): 359-370.
- Ogilvy-Stuart AL, and Brain CE. Early assessment of ambiguous genitalia. *Archives of Disease in childhood.* 2004; 89(5): 401-407.
- Ohnesorg T, Vilain E, and Sinclair AH. The genetics of disorders of sex development in humans. *Sex Dev.* 2014; 8(5): 262-272.
- Okeigwe I, and Kuohung W. 5-Alpha reductase deficiency: a 40-year retrospective review. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obesity.* 2014; 21(6): 483-487.
- Omrani M, Adamovic T, Grandell U, et al. 17-b-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 deficiency in three adult Iranian siblings. *Sex Dev.* 2011; 5(6): 273-276.
- Ostrer H. Disorders of sex development (DSDs): an update. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99(5): 1503-1509.
- Othman H, Khambatta S, Seth M, et al. Differences in sex-related bleeding and outcomes after percutaneous coronary intervention: Insights from the Blue Cross Blue Shield of Michigan Cardiovascular Consortium (BMC2) registry. *Am. Heart J.* 2014; 68(4): 552-559.
- Ottolenghi C, and McElreavey K. Deletions of 9p and the quest for a conserved mechanism of sex determination. *Mol. Genet. Metab.* 2000; 71: 397-404.
- Ottolenghi C. Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 2005; 14: 2053-2062.
- Papparella A, Zamparelli M, Cobellis G, et al. Laparoscopy for nonpalpable testis: is inguinal exploration always necessary when the cord structures exit the inguinal ring. *Pediatr Endosc Innov Tech.* 1999; 3: 29-33.

- Parivesh A, Barseghyan H, Délot E, et al. Translating genomics to the clinical diagnosis of Disorders/Differences of Sex Development. *Curr Top Dev Biol.* 2019; 134: 317-375.
- Parlak M, Durmaz E, Gursoy S, et al. Try235Phe homozygous mutation of the steroid 5- α reductase type 2 (SRD5A2) gene in a Turkish patient. *Ann Saudi Med.* 2014; 34(3): 254-256.
- Parma P, Radi O, Vidal V, et al. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet.* 2006; 38: 1304-1309.
- Parmar K, D'Andrea A, and Niedernhofer L. Mouse models of Fanconi anemia. *Mutat Res.* 2009; 668(1-2): 133-140.
- Payne AH, and Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev.* 2004; 25: 947-970.
- Penning TM. The aldo-ketoreductases (AKRs): Overview. *Chem Biol Interact.* 2015; 234: 236-246.
- Pepling ME, and Spradling AC. Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordial Follicles. *Dev. Biol.* 2001; 234: 339-351.
- Pereira FA, Qiu Y, Zhou G, et al. The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Dev.* 1999; 13: 1037-1049.
- Pérez de Nanclares G, Castaño L, Bilbao JR, et al. Molecular analysis of Frasier syndrome: mutation in the WT1 gene in a girl with gonadal dysgenesis and nephronophthisis. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2002; 15(7): 1047-1050.
- Phan-hug F, Kraus C, Paoloni-giacobino A, et al. Patients avec variation du développement sexuel: un exemple de prise en charge interdisciplinaire. *Rev Med Suisse.* 2016; 12: 1923-1929.
- Philibert P, Biason-Lauber A, Gueorguieva I and al: Molecular analysis of WNT4 gene in four adolescent girls with Müllerian duct abnormality and hyperandrogenism (atypical Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome). *Fertil Steril.* 2011; 95: 2683-2686.
- Picard JY and Josso N. Persistent Müllerian duct syndrome: an update. *Reprod Fertil Dev.* 2019; 31(7): 1240-1245.
- Picard JY, Cate RL, Racine C, and al. The Persistent Müllerian Duct Syndrome: An Update Based Upon a Personal Experience of 157 Cases. *Sex Dev.* 2017; 11(3): 109-125.
- Pirgon Ö, and Dündar BN. Vanishing Testes: A Literature Review. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2012; 4(3): 116-120.
- Polanco JC, Wilhelm D, Davidson TL, et al. Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Hum. Mol. Genet.* 2010; 19: 506-516.
- Polvani S, Pepe S, Milani S, et al. COUP-TFII in Health and Disease. *Cells.* 2019; 9(1): 101.

- Portnoi MF, Dumargne MC, Rojo S, et al. Mutations involving the SRY-related gene SOX8 are associated with a spectrum of human reproductive anomalies. *Hum Mol Genet.* 2018; 27(7): 1228-1240.
- Qiao J, and Han B. Diseases caused by mutations in luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2019; 161: 69-89.
- Qin J, Tsai MJ, and Tsai SY. Essential roles of COUP-TFII in Leydig cell differentiation and male fertility. *PLoS One.* 2008; 3(9): 3285.
- Rafigh M, Salmaninejad A, Khorashad BS, et al. Novel Deleterious Mutation in Steroid-5 α -Reductase-2 in 46, XY Disorders of Sex Development: Case Report Study. *Fetal Pediatr Pathol.* 2020; 25: 1-8.
- Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, et al. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* 2000; 14: 258-2595.
- Rey R, Josso N, and Racine C. Sexual Differentiation. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext.* South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.2000-2020. 2020: 5-87.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015; 17(5): 405-424.
- Roberts AE, Araki T, Swanson KD, et al. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nature Genetics.* 2007; 39(1): 70-74.
- Rocha VBC, Guerra-Júnior G, Marques-de-Faria AP, et al. Complete gonadal dysgenesis in clinical practice: the 46,XY karyotype accounts for more than one third of cases. *Fertil Steril.* 2011; 96(6): 1431-1434.
- Romdhane R, Mezzi N, Hamdi Y, et al. Consanguinity and Inbreeding in Health and Disease in North African Populations. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2019; 20: 155-179.
- Rosler A. 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency in the Mediterranean population. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 2006; 3(3): 455-461.
- Rossetti R, Di Pasquale E, Marozzi A, et al. BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum Mutat.* 2009; 30: 804-810.
- Ruiz-Arana IL, Hubner A, Cetingdag, et al. A novel hemizygous mutation of MAMLD1 in a patient with 46,XY complete gonadal dysgenesis. *Sex Dev.* 2015; 9 (2): 80-85.
- Sadlecki P, Grzanka D, and Grabiec M. Testing for NRAS Mutations in Serous Borderline Ovarian Tumors and Low-Grade Serous Ovarian Carcinomas. *Dis Markers.* 2018; 1497879: 1-7.

- Saez JM. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev.* 1994; 15: 574-626.
- Sarafoglou K, and Ostrer H. Clinical review 111: familial sex reversal: a review. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(2): 483-493.
- Sargent KM, McFee RM, Gomes RS and al. Vascular endothelial growth factor A: just one of multiple mechanisms for sex-specific vascular development within the testis? *J Endocrinol.* 2015; 227(2): 31-50.
- Sax L. How common is Intersex? A response to Anne Fausto-Sterling. *J Sex Res.* 2002; 39(3): 174-178.
- Schlessinger D, Garcia-Ortiz JE, Forabosco A, et al. Determination and Stability of Gonadal Sex. *J Androl.* 2010; 31(1): 16-25.
- Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, et al. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development.* 2000; 127: 65-73.
- Schoenwolf GC, Bleyl S, Brauer P, et al. Larsen's human embryology. 4th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2009; Pp: 576.
- Seale LA, Ogawa-Wong AN, et al. Berry MJ. Sexual dimorphism in selenium metabolism and selenoproteins. *Free Radic Biol Medicine.* 2018; 127(1): 198-205.
- Sekido R, and Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature.* 2008; 453 (7197): 930-934.
- Selby DM. Sexual maldevelopment syndromes. In: Stocker JT, Dehner LP. Editors. *Pediatric Pathology.* Philadelphia: Pa: JB Lippincott Co; 1992. 117-159.
- Shah K, Jan A, Ahmad F, Basit S, et al. Woodhouse-Sakati syndrome in a family is associated with a homozygous start loss mutation in the DCAF17 gene. *Clinical and Experimental Dermatology.* 2020 ; 45(2): 159-164.
- She ZY, and Yang WX. Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *J Mol Endocrinol.* 2014; 53(1): 21-37.
- She ZY, and Yang WX. SOX family transcription factors involved in diverse cellular events during development. *Eur J Cell Biol.* 2015; 94: 547-563.
- Simonis N, Migeotte I, Lambert N, et al. FGFR1 mutations cause Hartsfield syndrome, the unique association of holoprosencephaly and ectrodactyly. *J Med Genet.* 2013; 50(9): 585-592.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990; 346(6281): 240-244.
- Song X, Xie Y, Kang R, et al. FANCD2 protects against bone marrow injury from ferroptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016; 480(3): 443-449.

- Speiser PW, and White PC. Congenital Adrenal Hyperplasia. *N Engl J Med.* 2003; 349: 776-788.
- Sprissler R, Perkins B, Johnstone L, et al. Rare Tumor-Normal Matched Whole Exome Sequencing Identifies Novel Genomic Pathogenic Germline and Somatic Aberrations. *Cancers (Basel).* 2020; 12(6): 1618.
- Stamou MI, and Georgopoulos NA. Kallmann syndrome: phenotype and genotype of hypogonadotropic hypogonadism. *Metabolism.* 2018; 8(1): 124-134.
- Stamou MI, Varnavas P, Plummer L, et al. Next-generation sequencing refines the genetic architecture of Greek GnRH-deficient patients. *Endocr Connect.* 2019; 8(5): 468-480.
- Svingen T, and Koopman P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev.* 2013; 27(22): 2409-2426.
- Szczepanek-Parulska E, Budny B, Borowczyk M, et al. Compound heterozygous GLI3 variants in siblings with thyroid hemigenesis. *Endocrine.* 2021; 71(1): 514-519.
- Tachdjian G, Brisset S, Courtot AM, et al. *Embryologie et histologie humaines.* Elsevier Masson. 2016; Pp : 376.
- Takasawa K, Kashimada, K, Pelosi E, et al. FOXL2 transcriptionally represses Sf1 expression by antagonizing WT1 during ovarian development in mice. *FASEB J.* 2014; 28: 2020-2028.
- Tanaka SS, and Nishinakamura R. Regulation of male sex determination: genital ridge formation and Sry activation in mice. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71(24): 4781-4802.
- Taylor DM, Thum MY, and Abdalla H. Dichorionic triamniotic triplet pregnancy with monozygotic twins discordant for trisomy 13 after preimplantation genetic screening: Case report. *Fertil and Steril.* 2008; 90 (5): 5-9.
- Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, et al. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development.* 2002; 129: 4627-4634.
- Thyen U, Lanz K, Holterhus PM, et al. Epidemiology and initial management of ambiguous genitalia at birth in Germany. *Horm. Res.* 2006; 66(4): 195-203.
- Timmers C, Taniguchi, J Hejna, C Reifsteck, et al. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Molecular Cell.* 2001; 7(2): 241- 248.
- Tsai-Morris CH, Geng Y, Buczko E, et al. A novel human luteinizing hormone receptor gene. *J. Clin. Endocr. Metab.* 1998; 83: 288-291.
- Tsay CJ, Stratakis CA, Faucz FR, et al. Harvey Cushing Treated the First Known Patient With Carney Complex. *J Endocr Soc.* 2017; 1(10): 1312–1321.
- Turan I, Hutchins BI, Hacıhamdioglu BH, et al. CCDC141 Mutations in Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017; 102(6): 1816-1825.

- Uehara S, Hashiyada M, Sato K and al. Complete XY gonadal dysgenesis and aspects of the SRY genotype and gonadal tumor formation. *J Hum Genet.* 2002; 4(6): 2784-2792.
- Val P, and Swain A. Gene dosage effects and transcriptional regulation of early mammalian adrenal cortex development. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 323: 105-114.
- van Der Zwan YG, Biermann K, Wolffenbuttel KP, et al. Gonadal maldevelopment as risk factor for germ cell cancer: towards a clinical decision model. *Eur Urol.* 2015; 67: 692-701.
- Van Dijk FS, and Sillence DO. Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. *Am J MedGenet A.* 2014; 164: 1470- 1481.
- van Niekerk WA, and Retief AE. The gonads of human true hermaphrodites. *Hum Genet.* 1981; 58(1): 117-122.
- Verkauskas G, Jaubert F, Lortat-Jacob S, et al. The long-term follow up of 33 cases of true hermaphroditism: a 40-year experience with conservative gonadal surgery. *J Urol.* 2007; 177: 726-731.
- Viger RS, Mertineit C, Trasler JM, et al. Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter. *Dev. Camb. Engl.* 1998; 125: 2665-2675.
- Vikraman J, Hutson JM, Li R, et al. The undescended testis: Clinical management and scientific advances. *Semin Pediatr Surg.* 2016; 25(4): 241- 248.
- Vuthy E, Bergougnoux A, and Philibert P. How Far Should We Explore Hypospadias? Next-generation Sequencing Applied to a Large Cohort of Hypospadiac Patients. *Eur Urol.* 2021; 79(4): 507-515.
- Walter KN, Kienzle FB, Frankenschmidt A, et al. Difficulties in diagnosis and treatment of 5alpha-reduc- tase type 2 deficiency in a newborn with 46,XY DSD. *Horm Res Paediatr.* 2010; 74(1): 67-71.
- Wang D, Huang B, Zhang S, et al. Structural basis for R-spondin recognition by LGR4/5/6 receptors. *Genes Dev.* 2013; 27: 1339-1344.
- Wang D, Niu Y, Tan J, et al. Combined in vitro and in silico analyses of FGFR1 variants: genotype phenotype study in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Clin Genet.* 2020; 98(4): 341-352.
- Wang H, Xu Y, Liu X, et al. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in 131 Chinese families with dystrophinopathy. *Prenat. Diagn.* 2017; 37: 356-364.
- Wang H, Zhang L, Wang N, et al. Next-generation sequencing reveals genetic landscape in 46, XY disorders of sexual development patients with variable phenotypes. *Hum Genet.* 2018; 137(3): 265-77.
- Weiss J, Meeks JJ, Hurley L, et al. Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(22): 8084-8091.

- White PC, New MI, and Dupont B. HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81(23): 7505-7509.
- Wilhelm D, Palmer S, and Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev*. 2007; 87(1): 1-28.
- Wilson JD, Rivarola MA, Mendonca BB, et al. Advice on the management of ambiguous genitalia to a young endocrinologist from experienced clinicians. *Sem Reprod Med* 2012; 30(5): 339-350.
- Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, et al. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet*. 1995; 9(1): 15-20.
- Xu D, Lu L, Xi L, et al. Efficacy and safety of percutaneous administration of dihydrotestosterone in children of different genetic backgrounds with micropenis. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2017; 30(12): 1285-1291.
- Xu Y, Wang Y, Li N, et al. New insights from unbiased panel and whole-exome sequencing in a large Chinese cohort with disorders of sex development. *Eur J Endocrinol*. 2019; 181(3): 311-323.
- Yamada G, Satoh Y, Baskin LS, et al. Cellular and molecular mechanisms of development of the external genitalia. *Differentiation*. 2003; 71: 445-460.
- Yang J, Ellinor PT, Sather WA, et al. Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels. *Nature*. 1993; 366 (6451): 158-161.
- Yang Y, Workman S, and Wilson M. The molecular pathways underlying early gonadal development. *J. Mol. Endocrinol*. 2018; 62: 47-64.
- Yang Z, Ye L, Wang W, et al. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency: Three case reports and a systematic review. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2017; 174: 141-145.
- Yuan S, Menga L, Zhangc Y, et al. Genotype-phenotype correlation and identification of two novel SRD5A2 mutations in 33 Chinese patients with hypospadias. *Steroids*. 2017; 125(1): 61-66.
- Zhao H, Chen ZJ, Qin Y, et al. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet*. 2008; 82(6): 1342- 1348.
- Zhu YS, and Imperato-McGinley JL. Disorders of Sex Development in Males: Molecular Genetics, Epigenetics, Gender Identity, and Cognition. *Hormones, Brain and Behavior*. 3e Ed. 2017; 4: 59-103.
- Zidoune H, Martinerie L, Tan DS, et al. Expanding DSD Phenotypes Associated with Variants in the DEAH-Box RNA Helicase DHX37. *Sex Dev*. 2021; 22: 1-9.
- Zwijnenburg PJ, Meijers-Heijboer H, and Boomsma DI. Identical but not the same: The value of discordant monozygotic twins in genetic research. *Am J Med Genet B: Neuropsychiatr Genet*. 2010; 153(6): 1134-1149.

Annexes

Annexe 1

**Tableau récapitulatif des gènes impliqués dans le développement gonadique
(testicules et ovaires) (Baetens *et al.*, 2019)**

Gène/ No OMIM	Alias	Locus	Mode de transmission	Phénotype DSD et associé
DSD 46,XY				
AMH 60957	<i>anti-mullerian hormone</i>	19p13.3	AR	Persistence des canaux de Müller
AMHR2 60956	<i>anti-mullerian hormone type II receptor</i>	12q13.13	AR	Persistence des canaux de Müller
AR 313700	<i>androgen receptor</i>	Xq12	XL	CAIS ou PAIS
ARX 300382	<i>aristaless-related homeobox, X-linked</i>	Xp22.13	XL	DG (lissencéphalie, épilepsie, DI)
ATRX 300032	<i>alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked</i>	Xq13.3	XL	DG, absence de structures Müllériennes (dysmorphie, DI, α -thalassémie)
BMP4 112262	<i>bone morphogenetic protein 4</i>	14q22.2	AD	Hypospadias
CBX2 602770	<i>chromobox 2</i>	17q25	-	DG, OGE féminins (Dysmorphie, anomalies oculaires, atrésie anale)
FGFR2 176943	<i>fibroblast growth factor receptor 2</i>	10q26.13	AD	DG complète (cranosynostose)
GATA4 600576	<i>gata-binding protein 4</i>	8p23	AD	DG, OGE ambigus (malformations cardiaques, hernie diaphragmatique)
HHAT 605743	<i>hedgehog acyltransferase</i>	1q32.2	AR	DG complète (nanisme, anomalies squelettiques, microcéphalie, hypoplasie cérébelleuse, anomalies faciales)
HOXA13 142959	<i>homeobox a13</i>	7p15.2	AD	Hypospadias, anomalies müllériennes (<i>hand-foot genital syndrome</i>)
INSL3 146738	<i>insulin-like 3</i>	19p13.11	AD	Cryptorchidie
MAMLD1 300120	<i>mastermind-like domain-containing protein 1</i>	Xq28	XL	Hypospadias et micropénis (myopathie myotubulaire)
MAP3K1 600982	<i>mitogen-activated kinase kinase kinase 1</i>	5q11.2	AD	DG complète ou partielle
NR0B1 300473	<i>nuclear receptor subfamily 0, group b, member 1</i>	Xq21.3	XL	DG, hypogonadisme hypogonadotrope (hypoplasie surrénalienne, fentes labio-palatines, DI)
NR5A1 184757	<i>nuclear receptor subfamily 5, group a, member 1</i>	9q33	AD	DG, hypospadias, micropénis, cryptorchidie (insuffisance surrénalienne)
RXFP2 606655	<i>relaxin/insulin-like family peptide receptor 2</i>	13q13.1	AD	Cryptorchidie
SOX8 605923	<i>sry-box 8</i>	16p13.3	AD	DG (infertilité masculine, insuffisance ovarienne prématurée)
SOX9 608160	<i>sry-related hmg-box gene 9</i>	17q24-q25	AD	DG (dysplasie campomélique, séquence de Pierre Robin)
SRD5A2 607306	<i>steroid 5-alpha-reductase 2</i>	2p23.1	AR	Défaut de virilisation, masculinisation pubertaire
SRY 400044	<i>sex determining region y</i>	Yp11.3	YL	DG complète
TSPYL1 604714	<i>tspy-like 1</i>	6q22.1	AR	DG, mort subite du nourrisson
WT1 607102	<i>transcription factor</i>	11p13	AD	DG, syndromes WAGR, Denys-Drash, Frasier
WWOX 605131	<i>ww domain-containing oxidoreductase</i>	16q23	AD	DG, OGE ambigus
ZFPM2 603693	<i>zinc finger protein, multitype 2</i>	8q22.3	AD	DG, OGE ambigus (anomalies cardiaques, hernie diaphragmatique)
ZNRF3 612062	<i>zinc finger and ring finger protein 3</i>	22q12.1	-	DG complète ou partielle

DSD 46,XX				
BRCA2 600185	<i>breast cancer 2</i>	13q13.1	-	Dysgénésie ovarienne, aménorrhée primaire, hypogonadisme hypergonadotrope (microcéphalie, tâches café-au-lait, leucémie aigue myélocytaire)
CYP21A2 613815	<i>cytochrome p450 family 21 subfamily a member 2</i>	6p21.33	AR	Virilisation des OGE (insuffisance surrénalienne)
ESR2 601663	<i>estrogen receptor 2</i>	14q23	-	Dysgénésie ovarienne, aménorrhée primaire
FSHR 136435	<i>follicle stimulating hormone receptor</i>	2p16.3	AR	Dysgénésie ovarienne hypergonadotrope (insuffisance ovarienne prématurée, infertilité masculine)
LHX1 601999	<i>lim homeobox 1</i>	17q12	AD	Aplasia Müllérienne
NR2F2 107773	<i>nuclear receptor subfamily 2 group f member 2</i>	15q26.2	-	Dysgénésie ovarienne, ovotestis, OGE ambigus (malformations cardiaques)
NR5A1 184757	<i>nuclear receptor subfamily 5 group a member 1</i>	9q33	AD	DSD testiculaire/ovotesticulaire 46,XX (insuffisance ovarienne prématurée)
NUP107 607617	<i>nucleoporin 107</i>	12q15	AR	Dysgénésie ovarienne, absence de puberté (syndrome néphrotique)
PSMC3IP 608665	<i>psmc3 interacting protein</i>	17q21.2	AR	Dysgénésie ovarienne
RSPO1 609595	<i>r-spondin 1</i>	1p34.3	AR	DSD testiculaire 46,XX (hyperkératose palmo-plantaire)
SOX3 313430	<i>sry-box transcription factor 3</i>	Xq27.1	XL	DSD testiculaire 46,XX (DI, hypopituitarisme)
SOX9 608160	<i>sry-box transcription factor 9</i>	17q24-q25	AD	DSD testiculaire 46,XX
SOX10 602229	<i>sry-box transcription factor 10</i>	22q13.1	AD	DSD testiculaire 46,XX, hypospadias
SRY 400044	<i>sex-determining region of y chromosom</i>	Yp11.3	YL	DSD testiculaire/ovotesticulaire 46,XX
WNT4 603490	<i>wnt family member 4</i>	1p36.12	AD/AR	Aplasia Müllérienne, hyperandrogénie, réversion sexuelle (syndrome SERKAL)
WT1 607102	<i>wilm's tumor 1</i>	11p13	AD	Dysgénésie ovarienne (syndrome néphrotique)
WWOX 605131	<i>ww domain containing oxidoreductase</i>	16q23	AD	Dysgénésie ovarienne

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

Annexe 2

Questionnaire

Service <input style="width: 80%;" type="text"/>	Médecin adressant le patient <input style="width: 80%;" type="text"/>	N°dossier <input style="width: 80%;" type="text"/>	
Identité		N°DSD <input style="width: 80%;" type="text"/>	
Nom <input style="width: 80%;" type="text"/>	Prénom <input style="width: 80%;" type="text"/>	Date de naissance <input style="width: 80%;" type="text"/>	
Daïra <input style="width: 80%;" type="text"/>	Wilaya <input style="width: 80%;" type="text"/>	Numéro de téléphone <input style="width: 80%;" type="text"/>	
Nombre de frère(s) <input style="width: 80%;" type="text"/>	Nombre de soeur(s) <input style="width: 80%;" type="text"/>	Ordre dans la fratrie <input style="width: 80%;" type="text"/>	
Motif de consultation <input style="width: 80%;" type="text"/>	Date de la 1ère consultation <input style="width: 80%;" type="text"/>		
Sexe d'assignation			
Sexe d'assignation initial		Sexe d'assignation final	
<input type="radio"/> Masculin <input type="radio"/> Féminin <input type="radio"/> Aucun		<input type="radio"/> Masculin <input type="radio"/> Féminin <input type="radio"/> Aucun	
			Date de l'assignation définitive <input style="width: 80%;" type="text"/>
DD/MM/YYYY			
ATCD familiaux			
ATCD père			
Âge lors de la conception (ans) <input style="width: 80%;" type="text"/>	Nombre de frère(s) <input style="width: 80%;" type="text"/>	Nombre de soeur(s) <input style="width: 80%;" type="text"/>	
Tabac à chiquer avant conception <input style="width: 80%;" type="text"/>	Profession <input style="width: 80%;" type="text"/>	Depuis (année) <input style="width: 80%;" type="text"/>	Jusqu'à (année) <input style="width: 80%;" type="text"/>
Tabagisme avant conception <input style="width: 80%;" type="text"/>	Niveau scolaire	Milieu de vie	
Alcoolisme avant conception <input style="width: 80%;" type="text"/>	<input type="radio"/> Primaire <input type="radio"/> Moyen <input type="radio"/> Secondaire <input type="radio"/> Universitaire	<input type="radio"/> Rural <input type="radio"/> Urbain	
Anxylotique avant conception <input style="width: 80%;" type="text"/>			
ATCD mère			
Âge lors de la conception (ans) <input style="width: 80%;" type="text"/>	Nombre de frère(s) <input style="width: 80%;" type="text"/>	Nombre de soeur(s) <input style="width: 80%;" type="text"/>	Milieu de vie
ATCD pathologique(s)			<input type="radio"/> Rural <input type="radio"/> Urbain
<input type="radio"/> HTA gravidique <input type="radio"/> Diabète gestationnel <input type="radio"/> HCS <input type="radio"/> Hyperandrogénié au cours de la grossesse <input type="radio"/> Stérilité primaire	<input type="radio"/> Stérilité secondaire <input type="radio"/> Prise de progestatif(s) <input type="radio"/> Prise de corticoïde(s) <input type="radio"/> FCS <input type="radio"/> Anxiolytique(s)	Niveau scolaire	
			<input type="radio"/> Primaire <input type="radio"/> Moyen <input type="radio"/> Secondaire <input type="radio"/> Universitaire
Profession <input style="width: 80%;" type="text"/>	Depuis (année) <input style="width: 80%;" type="text"/>	Jusqu'à (année) <input style="width: 80%;" type="text"/>	
Consanguinité <input style="width: 80%;" type="text"/>	Degré de consanguinité <input style="width: 80%;" type="text"/>	Cas familiaux	
		<input type="radio"/> DSD <input type="radio"/> Hypospadias <input type="radio"/> Décès néonatal/aux (fille) <input type="radio"/> Décès néonatal/aux (garçon)	<input type="radio"/> HCS <input type="radio"/> Stérilité <input type="radio"/> Retard staturo-pondéral
Cas similaire(s) dans la famille <input style="width: 80%;" type="text"/>	Lien de parenté <input style="width: 80%;" type="text"/>		

ATCD néonatauxTerme de naissance
SGA
DSD constaté à la naissance
Poids de naissance
Taille de naissance
PC de naissance
Score d'Apgar à 1'
Poids de naissance percentiles
Taille de naissance percentiles
PC de naissance percentiles
Score d'Apgar à 5'
ATCD médicaux

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Grossesse gémellaire | <input type="radio"/> Cardiopathie |
| <input type="radio"/> RCIU | <input type="radio"/> Retard staturo-pondéral |
| <input type="radio"/> Prématurité | <input type="radio"/> Retard psychomoteur ou atteinte neurologique |
| <input type="radio"/> Infection materno-foetal | <input type="radio"/> Atteinte pulmonaire |
| <input type="radio"/> Ictère néonatal | <input type="radio"/> Infection urinaire à répétition |
| <input type="radio"/> Hypoglycémie néonatale | <input type="radio"/> Malformation urinaire |
| <input type="radio"/> Déshydratation à répétition | <input type="radio"/> Précocité pubertaire |

Âge constatation signes en année Âge constatation signes en mois **Examen clinique (première consultation)**Date de la 1ère consultation
Âge lors de la 1ère consultation en année
Âge lors de la 1ère consultation en mois
Poids en Kg Taille en cm IMC Poids en SDS Taille en SDS IMC en SDS Dysmorphie Type de dysmorphie **Description OGE**

Aspect bourgeon génital

Taille bourgeon génital Micropénis Aspect coudé

-
- Pénis
-
- Clitoris

Nombre d'orifices

Position orifice

Type sinus uro-génital

Gonade droite palpée

Gonades palpées

-
- 0
-
- 1
-
- 2

-
- Normal

-
- Urétral
-
- Vaginal

Gonade gauche palpée
Asymétrie

-
- Antérieur

Aspect sinus uro-génital

-
- Moyen

-
- Ouvert

-
- Pénien postérieur

-
- Partiellement ouvert

-
- Pénoscrotal

-
- Fermé

-
- Périnéal

Aspect bourrelets génitaux

Fusion médiane bourrelets génitaux

Forme bourrelets génitaux

Pigmentation bourrelets génitaux

-
- Lisse
-
-
- Strié

-
- Complète
-
-
- Incomplète (postérieure)
-
-
- Aucune

-
- Normal
-
-
- Hypoplasique

-
- Oui
-
- Non

Stade de Prader Score EMS

Description OGI

Echographie pelvienne

Présence d'un utérus

Présence de dérivés müllériens

Ovaire droit visualisé

Ovaire gauche visualisé

Ovaires visualisés

0

1

2

Testicule droit

Absent

En place

Inguinal

Abdominal

Testicule gauche

Absent

En place

Inguinal

Abdominal

Testicules visualisés

2 en place

1 en place 1 ectopique

1 en place 1 absent

1 ectopique 1 absent

2 ectopiques

2 absents

Génitographie Génito faite

Présence d'un utérus

Aouchement

Présence de dérivés müllériens

Présence d'une cavité vaginale

Chirurgie exploratrice résultats

Examen histologique

Tissu examiné

2 ovaires normaux

2 testicules normaux

1 ovaire 1 testicule

Dérivés müllériens

Epididyme

Stade pubertaire

A

P

S

R

A

P

G

Caryotype

Caryotype fait

Lieu caryotype

CHU Constantine

Kacimi

CHU Annaba

Pasteur-Cerba

CPMC

Ibn Rochd

Zerouala

Autre

Formule chromosomique

46XX

46XY

46XX/46XY

45X/46XY

Autre

Autre formule chromosomique

Lieu caryotype autre

Hormonologie

Bilan 1

Paramètre	Normes	Date du prélèvement	Âge(mois)	Âge(année)
FSH (mUI/l)				
LH (mUI/l)				
Testo(ng/ml)				
AMH(ng/ml)				
DHT(ng/ml)				
Cortisol(µg/dl)				
DOC(ng/ml)				
17OHP(nmol/L)				
17OHPPrégnéolone				
SDHE4(µg/dl)				
Rénine(pg/ml)				
E2 (nmol/l)				
ACTH(pg/ml)				
Delta4A(ng/ml)				

Bilan 2 Date prélèvement Âge (mois) Âge (année)

Test HCG

<input type="radio"/> Test HCG 6x1500	17OHP(nmol/l)2 <input type="text"/>	Normes <input type="text"/>		
<input type="radio"/> Test HCG 3x500	Testo2(ng/ml) <input type="text"/>	Normes <input type="text"/>	Testo avant HCG(ng/ml) <input type="text"/>	Normes <input type="text"/>
<input type="radio"/> Test ovitrelle 1x6250	PG <input type="text"/>	Normes <input type="text"/>	Testo après HCG(ng/ml) <input type="text"/>	Normes <input type="text"/>
<input type="radio"/> Test ovitrelle 2x3150			DHT avant HCG (ng/ml) <input type="text"/>	Normes <input type="text"/>
<input type="radio"/> Synacthène	Delta4A (ng/ml) <input type="text"/>	Normes <input type="text"/>	DHT après HCG (ng/ml) <input type="text"/>	Normes <input type="text"/>

AMH(pmol/l) Normes Âge

Ionogramme sérique

Na+(mEq/l) K+(mEq/l) Cl- (mEq/l) GAJ (g/l) Date prélèvement

Etude génétique

N°enregistrement patient <input type="text"/>	N°enregistrement père <input type="text"/>	N°enregistrement mère <input type="text"/>	Date prélèvement <input type="text"/>
N°enregistrement soeur(s) <input type="text"/>	N°enregistrement frère(s) <input type="text"/>		

Diagnostic

Type de DSD

46XX DSD 46XY DSD Autre

Autre type de DSD

Diagnostic

- | | |
|--|---|
| <input type="radio"/> 46XX DSD par bloc 21-hydroxylase | <input type="radio"/> 46XY DSD CAIS |
| <input type="radio"/> 46XX DSD par bloc 11-hydroxylase | <input type="radio"/> 46XY DSD 3BHSD |
| <input type="radio"/> 46XX DSD déficit 3 BHSD | <input type="radio"/> 46XY DSD dysgénésie gonadique partielle |
| <input type="radio"/> Hypertrophie clitoridienne | <input type="radio"/> 46XY DSD dysgénésie gonadique pure |
| <input type="radio"/> 45X/46XY DSD | <input type="radio"/> 46XY DSD dysgénésie gonadique mixte |
| <input type="radio"/> 46XY DSD PAIS | <input type="radio"/> Syndrome polymalformatif |
| <input type="radio"/> 46XY DSD 5 alpha réductase | <input type="radio"/> Syndrome des testicules évanescents |

Autre

Psycho

Détresse des parents

<input type="radio"/> Légère	Refus de l'anomalie <input type="text"/>	Refus du changement de sexe <input type="text"/>
<input type="radio"/> Modérée		
<input type="radio"/> Sévère	Le patient est-il en accord psychologiquement avec le sexe d'assignation? <input type="text"/>	
<input type="radio"/> Très sévère	Troubles psychologiques liés à l'anomalie <input type="text"/>	

Détails psy

Evolution médicale

Annexe 3

Consentement éclairé d'une analyse génétique

Je soussigné(e), Mr/Mme.....(patient(e)/parent/ tuteur),
consens à ce que soit prélevé le sang de.....
en vue d'étudier mon anomalie/celle de mon enfant/ou de l'individu dont je suis légalement
responsable, afin de prendre part à l'étude de recherche intitulée « étude cytogénétique
et moléculaire des anomalies du développement sexuel ».

Je confirme que la doctorante **Housna ZIDOUNE** m'a bien expliqué la nature
des études qui seront effectuées sur mon sang, notamment le fait qu'elles fassent appel
aux techniques de biologie moléculaire et qu'elles peuvent s'étendre sur plusieurs années.

Je suis d'accord pour que l'échantillon et les données générées sur le formulaire
« informations au patient » peuvent être utilisés **en anonyme**, dans le cadre de projets
de recherche académique, afin d'améliorer la compréhension de la biologie humaine.

Signature et cachet du médecin traitant(e) :

Signature de l'intéressé(e):

Date : / /

Annexe 4

Protocole de la réalisation du caryotype

1. Réactifs pour la culture cellulaire et le caryotype

1.1 Réactifs pour la culture cellulaire

- RPMI 1640 sans bicarbonate, sans L-Glutamine,
- Solution de bicarbonate de sodium 7,5 %,
- Streptomycine,
- Pénicilline,
- L-Glutamine (200 mM),
- Sérum humain.

1.2 Réactifs pour la réalisation du caryotype

- Colchicine à 20 mg/l,
- PHA C (phytohémagglutinine C),
- Héparine de sodium,
- KCl (chlorure de potassium) à 5,6 g/l,
- Méthanol,
- Acide acétique glacial,
- Milieu EBS (Earl Balanced Salt),
- Phosphate de sodium anhydre (Na_2HPO_4),
- Giemsa liquide,
- Huile à immersion.

2. Mise en culture

Le sang est mis en culture dans des flacons du type Falcon avec le milieu de culture RPMI, fournit prêt à l'emploi nécessitant une dilution de 1/10. Sa préparation est réalisée avant utilisation extemporanément, et nécessite:

- 5 ml de milieu de culture RPMI,
- 1,350 ml de bicarbonate,
- 1 goutte de pénicilline (antibiotique),
- 1 goutte de streptomycine (antibiotique),
- 50 ml en qsp (en quantité suffisante pour) d'eau distillé stérile,

- 7 gouttes de NaOH pour ajuster le pH.

Ajouter le NaOH par goutte en notant le virage de la couleur jusqu'à l'obtention d'une teinte marron plus ou moins foncée, puis mettre dans chaque tube:

- 6,5 ml du milieu de culture RPMI prêt à l'emploi,
- 1,5 ml de sérum humain,
- 100 µl de PHA,
- 50 µl d'héparine,
- 200 µl de l'échantillon sanguin.

Dans le but d'obtenir un nombre suffisant de mitoses, la PHA est un mitogène utilisé pour stimuler les lymphocytes T et les transformer en lymphoblastes qui vont reprendre leur division cellulaire.

Les flacons du type Falcon sont ensuite mis dans une étuve à 37°C horizontalement, pendant 72 heures.

3. Caryotype standard

3.1 Blocage des mitoses

Le blocage des divisions cellulaires en métaphase (phase où les chromosomes sont condensés et visibles au maximum) se réalise dans les conditions suivantes :

- après les 72 heures, ajouter 150 µl de la colchicine pour bloquer les mitoses en métaphase, puis homogénéiser les tubes en les retournant doucement plusieurs fois,
- mettre les tubes dans l'étuve à 37°C pendant 1h30 en position horizontale pour la bonne action de la colchicine.

3.2 Choc hypotonique

Afin de libérer les chromosomes, un choc hypotonique par une solution saline est nécessaire pour la lyse des lymphocytes induisant la libération des chromosomes métaphasiques. Cette étape est établie de la manière suivante :

- transvaser le contenu de chaque flacon dans deux autres tubes de 15 ml pour chaque malade,
- centrifuger les tubes à 1500 tr/min pendant 10 min,
- jeter le surnageant et ajouter 0,5 ml de KCl à 5,6 g/l pour réaliser le choc hypotonique,

- mélanger le contenu du flacon par des agitations modérées jusqu'à dissolution totale du culot, puis mélanger vigoureusement,
- compléter jusqu'à 5 ml avec le KCl en qsp,
- remettre les tubes dans l'étuve à 37°C pendant 20 min en position horizontale.

3.3 Préfixation

Cette étape consiste en un lavage à l'aide d'une solution de fixation carnoy : un mélange de méthanol (proportions de 3V) et d'acide acétique (proportions de 1V) d'acide acétique, comme suit :

- laver à la solution de fixation pour l'élimination du reste du KCl,
- mélanger puis centrifuger à 1500 tr/min pendant 5 min,
- jeter le surnageant.

3.4 Fixation

La 1^{ère} fixation est réalisée dans les conditions suivantes :

- ajouter 0,5 ml de la solution de fixation,
- mélanger doucement jusqu'à dissolution totale du culot,
- compléter en qsp jusqu'à 5 ml avec la solution de fixation,
- laisser à l'air libre pendant 20 min,
- centrifuger à 1500 tr/min pendant 5 minutes puis verser le surnageant.

La 2^{ème} fixation est établie dans les mêmes conditions que l'étape précédente. Le surnageant est aspiré par une pipette, en laissant 0,5 à 1 ml de volume (un volume proportionnel avec la quantité du culot cellulaire). Ce paramètre aura son importance par la suite sur la détermination de la densité des lames en noyaux.

3.5 Étalement des lames et observation sous microscope

L'étalement des chromosomes sur lame s'effectue de la manière suivante :

- mélanger jusqu'à dissolution du culot dans le surnageant pour des mitoses observables sous microscope,
- déposer 5 gouttes séparées de la préparation sur chaque lame,
- laisser les lames sécher à l'air libre ou par passages rapides et successifs sur un bec Bunsen,
- colorier les lames par le Giemsa dilué au 1/20 ; le colorant est déposé sur la lame jusqu'à la couverture de toute sa surface,
- laisser le colorant agir pendant 20 min et rincer ensuite les lames à l'eau courante.

Sous microscope, les chromosomes en métaphase sont observables, les bonnes mitoses représentent des chromosomes bien visibles, structurés et individualisés.

NB : par mesure de sécurité, 2 cultures cellulaires sont réalisées pour chaque prélèvement, et pour chaque culture traitée avec succès 6 lames au minimum sont étudiées.

3.6 R-banding

Pour réaliser le R-banding, il est nécessaire d'avoir :

- des lames avec de bonnes mitoses,
- un milieu salin EBS (Earles Balance Salt) fournit dans des flacons de 500 ml, dilué au 1/10 avec de l'eau distillée,
- milieu de dénaturation qui est une solution Earle (tampon phosphaté, pH4,2) préparée au laboratoire et composée de:

- 68 g de NaCl,
- 4 g KCl,
- 1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
- 10 g de glucose,
- 2 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,
- 1,25 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
- 1000 ml d'eau distillée.

Après la préparation, une dilution au 1/10 avec de l'eau distillée est établie.

Au cours de cette étape, les chromosomes sont traités par la chaleur puis colorés au Giemsa comme suit :

- réhydrater les vieilles lames dans de l'eau distillée avant la dénaturation ; pendant au minimum de 10 min,
- préchauffer la solution dénaturante d'Earle à 87° C au bain marie dans des bacs en porcelaine pendant 20-30 minutes,
- mettre les lames dans cette solution pendant environ 30 min, puis les rincer à l'eau courante,
- colorier les lames par le Giemsa pendant 10-15 min,
- laisser les lames sécher à l'air libre ou par passages rapides et successifs sur un bec Bunsen
- observation sous microscope optique.

3.7 Classification des chromosomes

Les chromosomes sont classés selon leur taille décroissante et leur indice centromérique ($IC = p/p+q$). Cette technique de marquage en bandes permet d'individualiser chaque chromosome par le motif des bandes claires et des bandes sombres, favorisant ainsi une classification précise.

Annexe 5

Méthode d'extraction d'ADN au NaCl

1. Hémolyse du sang et préparation du culot leucocytaire

Le sang fraîchement récolté dans les tubes EDTA doit initialement être mélangé énergiquement à une solution hypotonique pour obtenir une hémolyse. Cette étape est réalisée à +4°C durant 10 à 20 min.

Le culot blanc, constitué essentiellement de leucocytes, est obtenu après avoir centrifugé le lysat pendant 10 min à 3900 tours/min et éliminé le surnageant en deux lavages comme suit :

Le 1^{er} lavage consiste à :

- mettre les 8-10 ml de sang dans un tube Falcon de 50 ml et compléter le volume jusqu'à 50 ml avec la solution de lyse TE (Tris EDTA) 20:5,
- laisser 10 min au congélateur à -18 à -20°C,
- centrifuger à 3900 tr/min pendant 10 min,
- éliminer délicatement le surnageant sans décoller le culot leucocytaire formé au fond du tube Falcon.

Le 2^{ème} lavage consiste à :

- ajouter le TE 20:5 au culot et compléter le volume jusqu'à 25 ml,
- laisser à -18 à -20°C pendant 10 min,
- centrifuger à 3900 tr/min pendant 5 min,
- verser délicatement le surnageant et garder le culot leucocytaire obtenu.

N.B: l'opération peut être bloquée à ce stade en conservant le culot obtenu dans un tube conique de 15 ml contenant du TE 10:1 à -20°C pendant plus d'un an pour une extraction ultérieure.

2. Lyse des leucocytes, digestion du complexe nucléoprotéique et libération de l'ADN

Pour assurer la libération de l'ADN, une dissolution des membranes des leucocytes ainsi qu'une digestion des protéines liées à cet ADN est nécessaire. Cette opération est réalisée dans les conditions suivantes :

- remettre le culot de leucocytes dans un tube Falcon de 15 ml,
- ajouter 3 ml de tampon de lyse (NaCl 400 mM, EDTA 2 mM, Tris 10 mM, pH 8,2),
- ajouter 200 µl du détergent anionique SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) à 10% pour lyser des leucocytes, inhiber l'action des nucléases, dénaturer les protéines cellulaires et activer la protéinase K,
- ajouter 100 µl de protéinase K à une concentration de 10 mg/ml qui digère toutes les protéines, particulièrement les nucléoprotéines pour libérer l'ADN nucléaire,
- mettre les tubes sous rotations dans une étuve à 37°C pendant une nuit pour assurer une bonne digestion protéique,
- après les 18h, mettre les tubes dans le congélateur à -18°C pendant 10 min.

N.B : pour une extraction plus rapide, le traitement par la protéinase K peut se réaliser pendant 1 à 2 h à 65 °C ou 2 à 3h à 56°C.

3. Extraction, purification et solubilisation de l'ADN

Afin d'éliminer les protéines par précipitation sélective, le lysat cellulaire doit être traité par une solution saline dans les conditions suivantes:

- ajouter 1 ml de NaCl (4M),
- agiter le tube vigoureusement manuellement,
- laisser 5 min dans le congélateur à -18°C pour accélérer la précipitation des protéines,
- centrifuger pendant 15 min à 2500 tours/min.

La précipitation de l'ADN est effectuée à l'aide de l'éthanol absolu, à haute concentration (2.5 le volume de l'échantillon), à froid et conservé à -80°C. L'éthanol rend la molécule d'ADN plus soluble en dégageant l'eau qui l'entoure après une légère agitation.

La molécule d'ADN peut précipiter par formation d'une pelote, visible à l'œil nu sous forme d'une méduse (filaments), qui est ensuite lavée et redissoute dans le tampon TE 10:1 (2 fois le volume de l'échantillon) de la manière suivante :

- récupérer la pelote par enroulement sur une pipette Pasteur,
- éliminer les sels en lavant la pelote d'ADN 2 fois dans l'éthanol à 70% préalablement mis dans des tubes Eppendorf de 1.5 ml,
- récupérer délicatement la pelote des tubes Eppendorf qui doivent rester ouverts durant environ 1h pour l'évaporation de l'éthanol et le séchage de l'ADN,
- réhydrater l'ADN dans une solution de TE et d'eau bidistillée,
- laisser les tubes Eppendorf sous rotations à 37°C pendant 7 jours pour assurer la solubilisation de la pelote d'ADN, puis à +4°C jusqu'à dissolution complète.

Annexe 6

Méthode de séquençage de la plateforme Illumina HiSeq2000

La plateforme de séquençage à l'aide d'un logiciel du fabricant génère des fichiers de lecture sous format « .fastq » contenant les reads (séquences lues).

Les reads d'intérêt sont alignés en utilisant comme référence le génome humain (GRCh37/hg19 ou GRCh38/hg38) *via* l'outil de cartographie Burrows-Wheeler Aligner (BWA) qui se compose de trois algorithmes :

- BWA-backtrack, conçu pour les lectures de séquences Illumina jusqu'à 100 pb,
- BWA-SW et BWA-MEM, conçus pour les séquences plus longues allant de 70 pb à 1 Mpb.

Les reads résultants sont ensuite obtenus sous format de fichiers BAM (binary alignment / map) à l'aide de l'outil SAMtools (sequence alignment map tools) version 0.1.18 qui représente une bibliothèque logicielle pour l'analyse et la manipulation des alignements au format SAM/BAM, en procédant par :

- le tri et la fusion des alignements,
- la suppression des doublons des données de la PCR,
- l'identification des informations par position : les SNP et les courts variants InDel,
- la présentation des alignements en format de texte.

Les fichiers BAM représentent un format de données utilisé pour cartographier des séquences d'ADN d'une façon binaire des fichiers SAM. Ces derniers sont un format de stockage des alignements des séquences de lectures courtes et longues (jusqu'à 128 Mpb) par rapport à la séquence de référence.

Les fichiers des SNP et des petits variants InDel sont conçus avec l'outil GATK (genome analysis tool kit) version 1.6, une bibliothèque logicielle structurée, principalement conçue pour traiter les exomes et les génomes entiers, générée avec la technologie de séquençage Illumina et qui permet :

- l'identification des SNP et des InDels des données de séquençage de nouvelle génération,
- le traitement et le contrôle de la qualité des données de séquençage à haut débit.

Pour chaque échantillon d'ADN, des lectures dupliquées sont établies à l'aide des outils Picard version 1.62 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) permettant ainsi la manipulation des données et des formats de séquençage à haut débit tels que les fichiers BAM et VCF (Variant Call Format). Ce dernier est un fichier texte de stockage et de représentation des données de polymorphisme d'ADN telles que les SNP et les InDel, de manière compressée.

Les nouveaux SNP sont déterminés par rapport à dbSNP138, qui est une source d'informations des SNP et des petites InDels, disponible sur le site web de NCBI (national center for biotechnology information) <ftp.ncbi.nih.gov/snp>.

Ces nouveaux variants sont analysés par une série d'outils bioinformatiques basés sur le site web du programme Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) (<http://www.ensembl.org/homosapiens/userdata/uploadvariations>).

Au final, l'ensemble des variants identifiés est listé sous format VCF par des outils comme GATK ou SAMtools.

Annexe 7

Protocole du séquençage Sanger

1. Purification des produits de PCR

La purification des produits de PCR est réalisée par le réactif ExoSAP-IT, un composé d'enzymes hydrolysant les amorces, les dNTP en excès et l'ADN simple brin, comme suit, :

- mettre 5 µl du produit de PCR dans un tube de 0,2 ml,
- ajouter 2 µl d'ExoSAP-IT,
- vortexer le tube,
- incuber au thermocycleur à 37°C pendant 15 min puis à 80°C pendant 15 min,
- conservez les échantillons à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2. Préparations de la plaque de séquençage

La préparation de la plaque de réaction de 96 puits MicroAmpR Optical est effectuée par l'ajout des réactifs suivants :

- 1 µl du milieu réactionnel BigDye Terminator v3.1 (1 x 800 µl) composé des didésoxyribonucléotides (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), des désoxynucléotides (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) et de l'enzyme Taq polymerase,
- 1,5 µl du tampon de séquençage 5X (2 x 1ml) composé de Tris-HCl et MgCl₂,
- 3,5 µl d'eau ultra pure Milli-Q,
- 0,5 µl de DMSO, agent organique facilitant l'amplification des séquences riches en GC.

Cette opération nécessite ensuite de :

- vortexer le mix,
- ajouter 2,9 µl de produit PCR purifié et 1,3 µl des amorces correspondantes dans chaque puits,
- vortexer le mélange,
- couvrir la plaque avec le film adhésif transparent,
- placer la plaque dans le thermocycleur et appliquer un cycle de séquençage à 94°C pendant 3 min puis 25 cycles avec une dénaturation à 96°C pendant 10 sec, une hybridation des amorces à 50°C pendant 5 sec et une polymérisation du fragment à 60°C pendant 4 min,
- maintenir la plaque à +4°C jusqu'à la purification.

3. Purification de la plaque

La purification des échantillons de la plaque se déroule selon le protocole d'Applied Biosystems (éthanol/ EDTA/ acétate de sodium) dans les conditions suivantes :

- centrifuger la plaque à 100xg pendant 1 min,
- mélanger un volume suffisant d'EDTA (125 mM) et d'acétate de sodium (3M) dans une proportion de 1:1,
- ajouter 2 µl de mélange dans chaque échantillon,
- rajouter 25 µl d'éthanol absolu dans chaque puits,
- mélanger en pipetant de haut en bas,
- incuber la plaque dans l'obscurité pendant 15 min à température ambiante,
- centrifuger la plaque à 3000xg pendant 30 min à +4°C,
- inverser la plaque sur un papier absorbant,
- centrifuger la plaque à 100xg pendant 1 min,
- ajouter 35 µl d'éthanol (70 %) dans chaque puits,
- centrifuger la plaque à 1650xg pendant 15 min à +4°C,
- inverser la plaque sur un papier absorbant,
- centrifuger la plaque à 190xg pendant 4 min,
- ajouter 12 µl d'eau ultra pure Milli-Q,
- ajouter 12 µL de formamide,
- fermer la plaque avec un film auto-adhésif,
- vortexer la plaque,
- retirer le film auto-adhésif et couvrir la plaque à l'aide du couvercle spécifique,
- placer la plaque de réaction dans l'analyseur génétique.

Annexe 8

Tableau exhaustif des gènes mutés dans la population d'étude

Genes No OMIM	Alias	Locus	Phénotype de la population d'étude associé No OMIM/ Référence
AMH 600957	<i>anti-Mullerian hormone</i>	19p13.3	Syndrome de la persistance des dérivés müllériens type I (261550)
ANOS1 300836	<i>anosmin 1</i>	Xp22.31	Hypogonadisme hypogonadotrope 1 avec ou sans anosmie (Syndrome de Kallmann 1) (308700)
AR 313700	<i>androgen receptor</i>	Xq12	Insensibilité aux androgènes (300068), hypospadias 1 (lié à l'X) (300633)
BBS7 607590	<i>Bardet-Biedl Syndrome 7</i>	4q27	Syndrome Bardet-Biedl 7 (615984)
CACNA1F 300110	<i>calcium channel voltage-dependent alpha-1F subunit</i>	Xp11.23	Maladie oculaire de l'île d'Aland (300600), dystrophie coronaire liée au chromosome X 3 (300476)
CHD7 608892	<i>chromodomain helicase DNA-binding protein 7</i>	8q12.2	Hypogonadisme hypogonadotrope 5 avec ou sans anosmie (612370)
COL1A1 120150	<i>collagène type I alpha-1</i>	17q21.33	Ostéogenèse imparfaite type III (259420)
DHX37 617362	<i>DEAH-box helicase 37</i>	12q24.31	Réversion sexuel 46,XY 11 (273250)
DMRT1 602424	<i>doublesex and Mab-3 related transcription factor 1</i>	9p24.3	Réversion sexuel 46,XY 4 (154230)
FANCB 300515	<i>FA complementation group B</i>	Xp22.2	Anémie de Fanconi, groupe de complémentation B (300514)
FGFR1 136350	<i>fibroblast growth factor receptor 1</i>	8p11.23	Hypogonadisme hypogonadotrope 2 avec ou sans anosmie (147950)
FGFR3 134934	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>	4p16.3	Syndrome lacrymo-auriculo-dento-digital (149730)
FLNA 300017	<i>filamin A, alpha</i>	Xq28	Syndrome oto-palato-digital type II (304120)
FLRT3 604808	<i>fibronectin-like domain-containing leucine-rich transmembrane protein 3</i>	20p12.1	Hypogonadisme hypogonadotrope 21 avec ou sans anosmie (615271)
FOXP1 605515	<i>forkhead box 1</i>	3p13	Retard mental avec troubles du langage avec ou sans caractéristiques autistiques (613670)
GHR 600946	<i>growth hormone receptor</i>	5p13.1-p12	Insensibilité partielle à l'hormone de croissance (604271)
GLI3 165240	<i>GLI-kruppel family member 3</i>	7p14.1	Syndrome de Pallister-Hall (146510)
GPC3 300037	<i>glypican-3</i>	Xq26.2	Syndrome de Simpson-Golabi-Behmel, type 1 (312870)
HOXA13 142959	<i>homeobox A13</i>	7p15.2	Syndrome main pied utérus (140000)
HSD17B3 605573	<i>17-beta hydroxysteroid dehydrogenase 3</i>	9q22.32	Pseudohermaphrodisme masculin avec gynécomastie (264300)

Genes No OMIM	Alias	Locus	Phénotype de la population d'étude associé No OMIM/ Référence
KAT6B 605880	<i>K(lysine) acetyltransferase 6B</i>	10q22.2	Syndrome de Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson (603736)
LHCGR 152790	<i>luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor</i>	2p16.3	Hypoplasie des cellules de Leydig avec hypogonadisme hypergonadotrope, hypoplasie des cellules de Leydig avec pseudohermaphrodisme (238320)
LHX3 600577	<i>LIM homeobox 3</i>	9q34.3	Déficit en hormones hypophysaires combiné 3
LHX4 602146	<i>LIM Homeobox 4</i>	1q25.2	Déficit en hormones hypophysaires combiné 4 (221750)
MYRF 608329	<i>myelin regulatory factor</i>	11q12.2	Syndrome cardio-urologique (618280)
NGLY1 610661	<i>N-glycanase 1</i>	3p24.2	Trouble congénital de la déglycosylation (615273)
NIPBL 608667	<i>nipped-B-like</i>	5p13.2	Syndrome de Cornelia de Lange 1 (122470)
NR5A1 184757	<i>nuclear receptor subfamily 5 group A member 1</i>	9q33.3	Réversion sexuel 46,XY (612965)
NRAS 164790	<i>neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>	1p13.2	Syndrome de Noonan 6 (613224)
OFD1 300170	<i>oral-facial-digital syndrome 1 gene</i>	Xp22.2	Syndrome de Joubert (300804)
PRKARIA 188830	<i>protein kinase CAMP-dependent type 1 regulatory subunit alpha</i>	17q24.2	Acrodysostose 1 avec ou sans résistance hormonale (101800)
PROK2 607002	<i>prokineticin 2</i>	3p13	Hypogonadisme hypogonadotrope 4 avec ou sans anosmie (610628)
PROKR2 607123	<i>prokineticin receptor 2</i>	20p12.3	Hypogonadisme hypogonadotrope 3 avec ou sans anosmie (244200)
ROR2 602337	<i>receptor tyrosine kinase like orphan receptor 2</i>	9q22.31	Syndrome de Robinow autosomique récessif (268310)
RXFP2 606655	<i>relaxin family peptide receptor 2</i>	13q13.1	Cryptorchidie (219050)
SEMA3A 603961	<i>semaphorin 3A</i>	7q21.11	Hypogonadisme hypogonadotrope 16 avec ou sans anosmie (614897)
SHH 600725	<i>sonic Hedgehog signaling molecule</i>	7q36.3	Syndrome de l'incisive centrale maxillaire médiane unique (147250)
SLC29A3 612373	<i>solute carrier family 29 (nucleoside transporters) member 3</i>	10q22.1	Syndrome histiocytose sinusale avec lymphadénopathie (602782)
SOS1 182530	<i>SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1</i>	2p22.1	Syndrome de Noonan 4 (610733)
SOX8 605923	<i>SRY-box 8</i>	16p13.3	DSD 46,XY (Portnoi <i>et al.</i> , 2018)
SPRY4 607984	<i>sprouty RTK signaling antagonist 4</i>	5q31.3	Hypogonadisme hypogonadotrope 17 avec ou sans anosmie (615266)
SRD5A2 607306	<i>steroid 5α-reductase 2</i>	2p23.1	Hypospadias périnéoscrotaux pseudovaginaux (264600)
ZFPM2 603693	<i>zinc finger protein, multitype 2</i>	8q23.1	Réversion sexuel 46,XY 9 (616067)

Résumés

Résumé

Les anomalies de détermination/différenciation sexuelle (DSD) constituent un groupe hétérogène d'affections congénitales dans lesquelles le sexe chromosomique, gonadique ou anatomique est discordant. Au cours de ces dernières années, un certain nombre de nouveaux gènes candidats ont été identifiés d'être impliqués dans les DSD et le rendement diagnostique en utilisant l'approche du séquençage de l'exome entier (WES) était remarquable.

L'objectif de notre étude menée sur des patients présentant un DSD (46,XY et 46,XX), est centré sur la recherche des variants géniques connus à l'origine des DSD dans la population algérienne, largement inexplorés, d'une part, et d'autre part d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les DSD et les présentations cliniques atypiques.

Patients et méthodes : environ 350 ADN (patients, parents et/ou fratrie) ont été extraits par la méthode au NaCl, pour réaliser un WES et une étude fonctionnelle *in silico* pour les 125 individus recrutés, ainsi que les parents de 34 patients. La détermination de la présence du gène *SRY* par PCR conventionnelle était systématique. En fonction de la disponibilité des ADN parentaux, la transmission de certains variants géniques a été mise en évidence par le séquençage Sanger.

Résultats et discussion : l'âge moyen au moment du diagnostic se situe de 1 jour à 22 ans et l'histoire de la consanguinité a été notée dans 36% des cas. L'étiologie génétique a été établie chez 49,6% (62/125) des individus, incluant 42,2% des patients DSD non syndromiques 46,XY et 69,2% des patients DSD syndromiques 46,XY. Les variants des gènes *AR*, *HSD17B3*, *NR5A1* et *SRD5A2* ont été les plus répandues dans notre cohorte. D'autres variants impliquant des gènes associés à l'HHC, ont été signalés, notamment les gènes *CHD7* et *PROKR2*. L'ensemble de 30 variants pathogènes/probablement pathogènes non rapportés précédemment, impliquant un total de 25 gènes différents à l'origine du DSD, ont été mis en évidence dans 24% de la cohorte. 11,5 % des membres du groupe DSD 46,XY ont été porteurs de variants classés comme pathogènes/probablement pathogènes dans plus d'un gène. En outre, 3 variants pathogènes/probablement pathogènes dans les gènes *CACNA1F*, *COL1A1* et *NGLY1* expliquant uniquement les phénotypes somatiques ont été enregistrés chez 3 cas. De même, 2 nouveaux variants de signification incertaine dans les gènes *SCLY* et *VEGFB* ont été identifiés dans une analyse comparative WES de jumeaux discordants pour le phénotype DSD. De plus, un autre variant du gène *NR2F2* a été noté chez un patient avec un DSD 46,XY. Par ailleurs, le recrutement des parents a permis d'établir un diagnostic génétique plus précis en classant les variants comme bénins, probablement bénins ou de signification indéterminée plutôt que pathogènes ou probablement pathogènes. La variabilité phénotypique observée chez les cas familiaux présentant des variants génétiques identiques peut être due à une pénétrance incomplète.

Conclusion: l'analyse moléculaire utilisant le WES et l'étude fonctionnelle *in silico* a permis d'établir un diagnostic génétique chez environ la moitié de la population d'étude. Cette technologie est utile pour la détection de variants mononucléotidiques et dinucléotidiques. Les variants de signification indéterminée nécessitent des travaux plus poussés pour élucider leurs rôles, permettant ainsi, l'élargissement du spectre phénotypique associé aux gènes connus pour causer les DSD. D'autres technologies sont également nécessaires pour détecter les causes génétiques chez les patients ne portant aucun variant.

Mot clés : DSD, WES, étude fonctionnelle *in silico*, gènes candidats, variants.

Abstract

Disorders of sex determination/differentiation (DSD) comprise a heterogeneous group of congenital conditions in which chromosomal, gonadal or anatomical sex is discordant. In recent years, a number of new candidate genes have been identified to be associated with DSD and the diagnostic yield using the whole exome sequencing (WES) approach has been remarkable.

The objective of our study performed on patients with DSD (46,XY and 46,XX), is focusing on the identification of known gene variants causing DSD in the Algerian population, largely unexplored, on the one hand, and on the other hand to identify new genes involved in DSD and atypical clinical features.

Patients and methods: approximately 350 DNAs (patients, parents and/or siblings) were extracted by NaCl method, to perform WES and *in silico* functional study for the 125 individuals recruited, as well as the parents of 34 patients. Determination of the presence of the *SRY* gene by conventional PCR was systematic. Depending on the availability of parental DNA, the transmission of certain gene variants was demonstrated by Sanger sequencing.

Results and discussion: the mean age at diagnosis ranged between 1 day to 22 years and a history of consanguinity was noted in 36% of cases. Genetic etiology was established in 49.6% (62/125) of individuals, including 42.2% of patients with 46,XY non-syndromic DSD and 69.2% of patients with 46,XY syndromic DSD. Variants in the *AR*, *HSD17B3*, *NR5A1* and *SRD5A2* genes were the most common in our cohort. Other variants involving genes associated with HHC have been reported, including *CHD7* and *PROKR2*. All 30 previously unreported pathogenic/probably pathogenic variants, involving a total of 25 different genes causing DSD, were found in 24% of the cohort. 11.5% of the 46,XY DSD group carried variants classified as pathogenic/likely pathogenic in more than one gene. In addition, 3 pathogenic/probably pathogenic variants in the *CACNA1F*, *COL1A1* and *NGLY1* genes explaining only somatic phenotypes were recorded in 3 cases. Similarly, 2 new variants of uncertain significance in the *SCLY* and *VEGFB* genes were identified by a WES comparative analysis of discordant twins for the DSD phenotype. In addition, another variant in the *NR2F2* gene was noted in a patient with 46,XY DSD. Furthermore, parental recruitment allowed to establish a more accurate genetic diagnosis by classifying the variants as benign, likely benign or of uncertain significance rather than pathogenic or likely pathogenic. The phenotypic variability observed in familial cases with identical genetic variants may be due to incomplete penetrance.

Conclusion: Molecular analysis using WES and functional study *in silico* revealed a genetic diagnosis in about half of the study population. This technology is useful for the detection of mononucleotide and dinucleotide variants. Variants of uncertain significance require further work to elucidate their roles, thus allowing for the broadening of the phenotypic spectrum associated with genes known to cause DSD. Other technologies are also needed to detect genetic causes in patients who do not carry any variants.

Keyword: DSD, WES, *in silico* functional analysis, candidate genes, variants.

الملخص

تشوهات التحديد / التمايز الجنسي (DSD) هي مجموعة غير متجانسة من الاضطرابات الخلقية التي يكون فيها تطور الجنس الكروموسومي أو التناسلي أو التشريحي غير نمطي. في السنوات الأخيرة ، تم تحديد عدد من الجينات المرشحة الجديدة للمشاركة في DSD وكان العائد التشخيصي باستخدام نهج تسلسل exome بأكمله (WES) ملحوظًا

الهدف من دراستنا ، التي أجريت على مرضى DSD (46,XX ; 46,XY) تتمحور حول البحث عن المتغيرات الجينية المعروفة في أصل DSD في السكان الجزائريين ، غير المكتشفة إلى حد كبير ، من ناحية ، ومن ناحية أخرى ، لتحديد الجينات الجديدة المشاركة في DSD والعروض السريرية غير النمطية.

المرضى والطرق: تم استخراج ما يقرب من 350 من الحمض النووي (المرضى والآباء و / أو الأشقاء) بطريقة كلوريد الصوديوم ، لإجراء مسح ودراسة وظيفية في السيليكو لـ 125 فردًا لديهم مجموعة واسعة من أنماط DSD الظاهرية ، بالإضافة إلى آباء 34 مريضًا. كان تحديد وجود جين *SRY* بواسطة PCR التقليدي منهجيًا. اعتمادًا على توافر الحمض النووي للوالدين ، تم إثبات انتقال بعض المتغيرات الجينية من خلال تسلسل سانجر.

النتائج والمناقشة: تراوح العمر عند التشخيص من يوم واحد إلى 22 عامًا ولوحظ تاريخ زواج الأقارب في 36٪ من الحالات. تم إنشاء المسببات الوراثية في 49.6٪ (125/62) من الأفراد ، بما في ذلك 42.2٪ من المرضى غير المتلازمين XY DSD46 ، 69.2٪ من مرضى DSD 46,XY المتلازمين. المتغيرات من جينات *AR* و *HSD17B3* و *NR5A1* و *SRD5A2* هي الأكثر شيوعًا في مجموعتنا. تم الكشف عن متغيرات أخرى تتضمن جينات مرتبطة بـ *HHC* ، بما في ذلك جينات *CHD7* و *PROKR2*. تم العثور على مجموعة من 30 من المتغيرات المسببة للأمراض / التي من المحتمل أن تكون مسببة للأمراض لم يتم الإبلاغ عنها سابقًا ، والتي تتضمن مجموعه 25 جينًا مختلفًا تسبب DSD ، في 24٪ من المجموعة. 11.5٪ من أعضاء المجموعة DSD 46, XY ، يحملون متغيرات مصنفة على أنها مسببة للأمراض / من المحتمل أن تكون مسببة للأمراض في أكثر من جين واحد. بالإضافة إلى ذلك ، تم تسجيل 3 متغيرات مسببة للأمراض / ربما تكون مسببة للأمراض في جينات *CACNA1F* و *COL1A1* و *NGLY1* تشرح فقط الأنماط الظاهرية الجسدية في 3 حالات. وبالمثل ، تم تحديد نوعين من المتغيرات الجديدة ذات الأهمية غير المؤكدة في جينات *SCLY* و *VEGFB* في تحليل مقارن WES للتوائم المتضاربة للنمط الظاهري DSD وبالإضافة إلى ذلك ، لوحظ نوع آخر من جين *NR2F2* في مريض لديه . XY , DSD 46 ، أتاح توظيف الوالدين إمكانية إنشاء تشخيص جيني أكثر دقة من خلال تصنيف المتغيرات على أنها حميدة ، وربما حميدة أو ذات أهمية غير محددة ، وليست مسببة للأمراض أو ربما مسببة للأمراض. قد يكون تباين النمط الظاهري الذي لوحظ في الحالات العائلية ذات المتغيرات الجينية المتطابقة بسبب الاختراق غير الكامل و / أو آليات انتقال قليلة المنشأ.

الخلاصة: أدى التحليل الجزيئي باستخدام WES والدراسة الوظيفية للسيليكو إلى إنشاء تشخيص جيني في ما يقرب من نصف مجتمع الدراسة. هذه التكنولوجيا مفيدة للكشف عن متغيرات أحادي النوكليوتيد وثنائي النوكليوتيد. تتطلب المتغيرات ذات الأهمية غير المحددة مزيدًا من العمل لتوضيح أدوارها ، وبالتالي تمكين توسيع الطيف الظاهري المرتبط بالجينات المعروفة أنها تسبب DSD. هناك حاجة أيضًا إلى تقنيات أخرى للكشف عن الأسباب الجينية في المرضى الذين لا يحملون أي متغيرات.

الكلمات المفتاحية: DSD ، WES ، دراسة وظيفية في السيليكو ، الجينات المرشحة ، المتغيرات .

Publication

Année universitaire : 2021/2022

Présentée par : ZIDOUNE Housna

Intitulé

Etude cytogénétique et moléculaire des désordres du développement sexuel

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3^{ème} cycle LMD

RESUME

Les anomalies de détermination/différenciation sexuelle (DSD) constituent un groupe hétérogène d'affections congénitales dans lesquelles le sexe chromosomique, gonadique ou anatomique est discordant. Au cours de ces dernières années, un certain nombre de nouveaux gènes candidats ont été identifiés d'être impliqués dans les DSD et le rendement diagnostique en utilisant l'approche du séquençage de l'exome entier (WES) était remarquable.

L'objectif de notre étude menée sur des patients présentant un DSD (46,XY et 46,XX), est centré sur la recherche des variants géniques connus à l'origine des DSD dans la population algérienne, largement inexplorés, d'une part, et d'autre part d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les DSD et les présentations cliniques atypiques.

Patients et méthodes : environ 350 ADN (patients, parents et/ou fratrie) ont été extraits par la méthode au NaCl, pour réaliser un WES et une étude fonctionnelle *in silico* pour les 125 individus recrutés, ainsi que les parents de 34 patients. La détermination de la présence du gène SRY par PCR conventionnelle était systématique. En fonction de la disponibilité des ADN parentaux, la transmission de certains variants géniques a été mise en évidence par le séquençage Sanger.

Résultats et discussion : l'âge moyen au moment du diagnostic se situe de 1 jour à 22 ans et l'histoire de la consanguinité a été notée dans 36% des cas. L'étiologie génétique a été établie chez 49,6% (62/125) des individus, incluant 42,2% des patients DSD non syndromiques 46,XY et 69,2% des patients DSD syndromiques 46,XY. Les variants des gènes *AR*, *HSD17B3*, *NR5A1* et *SRD5A2* ont été les plus répandues dans notre cohorte. D'autres variants impliquant des gènes associés à l'HHC, ont été signalés, notamment les gènes *CHD7* et *PROKR2*. L'ensemble de 30 variants pathogènes/probablement pathogènes non rapportés précédemment, impliquant un total de 25 gènes différents à l'origine du DSD, ont été mis en évidence dans 24% de la cohorte. 11,5% des membres du groupe DSD 46,XY ont été porteurs de variants classés comme pathogènes/probablement pathogènes dans plus d'un gène. En outre, 3 variants pathogènes/probablement pathogènes dans les gènes *CACNA1F*, *COL1A1* et *NGLY1* expliquant uniquement les phénotypes somatiques ont été enregistrés chez 3 cas. De même, 2 nouveaux variants de signification incertaine dans les gènes *SCLY* et *VEGFB* ont été identifiés dans une analyse comparative WES de jumeaux discordants pour le phénotype DSD. De plus, un autre variant du gène *NR2F2* a été noté chez un patient avec un DSD 46,XY. Par ailleurs, le recrutement des parents a permis d'établir un diagnostic génétique plus précis en classant les variants comme bénins, probablement bénins ou de signification indéterminée plutôt que pathogènes ou probablement pathogènes. La variabilité phénotypique observée chez les cas familiaux présentant des variants génétiques identiques peut être due à une pénétrance incomplète.

Conclusion: l'analyse moléculaire utilisant le WES et l'étude fonctionnelle *in silico* a permis d'établir un diagnostic génétique chez environ la moitié de la population d'étude. Cette technologie est utile pour la détection de variants mononucléotidiques et dinucléotidiques. Les variants de signification indéterminée nécessitent des travaux plus poussés pour élucider leurs rôles, permettant ainsi, l'élargissement du spectre phénotypique associé aux gènes connus pour causer les DSD. D'autres technologies sont également nécessaires pour détecter les causes génétiques chez les patients ne portant aucun variant.

Mots clés : DSD, WES, étude fonctionnelle *in silico*, gènes candidats, variants.

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire (Université Salah Boubnider, Constantine 3).

Unité de génétique du développement humain, Institut Pasteur, Paris, France.

Président du jury :	SATTA Dalila	Pr. Université Frères Mentouri, Constantine 1
Directeur :	CHELLAT Djalila	Pr. Université Frères Mentouri, Constantine 1
Co-directeur :	MCELREAVEY Kenneth	Dr. Institut Pasteur, Paris, France
Examineurs :	ABADI Nouredine	Pr. Université Salah Boubnider, Constantine 3
	CHAOUI Naouel	Pr. Université Frères Mentouri, Constantine 1